Untersuchungen zur Funktion von ω-Cyclohexanfettsäuren in Bacillus acidocaldarius

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Krischke

aus München

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0025

Untersuchungen zur Funktion von ω-Cyclohexanfettsäuren in Bacillus acidocaldarius

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Krischke

aus München

1986

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 9. 1986

Dekan: Prof. Dr. R. Hampp

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Poralla

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K.G. Hantke

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Januar 1983 und März 1986 am Institut für Biologie II, Mikrobiologie I (Prof. Dr. H. Zähner) der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. K. Poralla danke ich für die Überlassung des Themas und für seine ständige Bereitschaft zu Anregungen und Diskussionen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. A. Blume (Inst. f. phys. Chemie II, Universität Freiburg, Prof. Dr. Th. Ackermann) und seinen Mitarbeitern für die Einführung in die Techniken der Dichtemessung und Kalorimetrie sowie für die Hilfe bei der Auswertung der Meßergebnisse.

Herrn Prof. H.G. Floss (Department of Chemistry, Ohio State University, Columbus), Herrn Dr. L. Cattel (Instituto die Chimica Farmaceutica Applicata, Torino) und Herrn Prof. Dr. M. Rohmer (Ecole Nationale Supérieure de Chimie, Mulhouse) danke ich für die Überlassung verschiedener Substanzen, Herrn Prof. Dr. G. Winkelmann (Mikrobiologie I, Universität Tübingen) und seinen Mitarbeitern für freundliche Unterstützung mit Chemikalien und Geräten. Bei Herrn Dr. K. Geckeler (Inst. f. org. Chemie, Universität Tübingen) bedanke ich mich für die Synthese diverser Substanzen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Thomas Härtner sowie meinen Arbeitskolleginnen und -kollegen für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn und Frau Peters (Inst. f. org. Chemie, Universität Tübingen) danke ich für die Anfertigung der Massenspektren.

Den Mitgliedern der Werkstätten Biologie I und II sowie Herrn Bok danke ich für die Hilfe bei verschiedenen technischen Problemen.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie für die moralische und physische Unterstützung meiner Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 1

2. MATERIAL UND METHODEN 13

2.1. Chemikalien 13

2.2. Verwendete Organismen 15

2.3. Nährmedien 15

2.3.1. Flüssigmedien 15
2.3.2. Feste Medien 16
2.3.3. Waschflüssigkeiten 17
2.3.3.1. Salzlösung 17
2.3.3.2. Synthetisches Medium 17

2.4. Kulturbedingungen und Wachstumskontrolle 17

2.4.1. Schüttelkulturen 17
2.4.2. Fermentation 17
2.4.3. Plattenkulturen 18
2.4.4. Messung der optischen Dichte . . . 18

2.5. Ernten der Zellen 18

2.6. Aufbewahren der Stämme und Mutanten . . 18

2.7. Erzeugung und Selektion der Mutanten . . 19

2.7.1. Selektionsprinzip 19
2.7.2. Mutagenese 19
2.7.3. Selektion der azaleucinresistenten Mutanten 20

2.8. Wachstumsversuche, Testverfahren 20

2.8.1. Biophotometerversuche 20
2.8.2. Shiftexperimente, Schockversuche . 21
2.8.3. Fütterung von Vorstufen und potentiellen Hemmstoffen 21
2.8.4. Kreuzfütterungstest 22

2.9. Trockengewichtsbestimmung 23

2.10. Proteinbestimmung 23

2.11. Analyse des Hefeextraktes 24

2.11.1. Ionenaustauschchromatographie . . 24
2.11.2. Gelfiltration 25
2.11.3. Dünnschichtchromatographie von Hefeextrakt 25

2.12. Messung des Sauerstoffverbrauchs 26

2.12.1. Aufbau des Gerätes 26
2.12.2. Eichung der Elektrode 26
2.12.3. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von Zellsuspensionen 27

2.13. ATP-Messungen 27

2.14. Transportmessungen 28

2.15. Lipidextraktion 30

2.16. Lipidanalytik 31

2.16.1. Extraktion der Fettsäuren 31
2.16.2. Veresterung der Fettsäuren 31
2.16.3. Hydrierung der Fettsäuremethylester 31
2.16.4. Gaschromatographie der Fettsäuren 32
2.16.5. Quantitative Bestimmung der Fettsäuren 32
2.16.6. Hopanextraktion und Derivatisierung 33
2.16.7. Gaschromatographie der Hopane . . 34
2.16.8. Dünnschichtchromatographie der Lipide : 34
2.16.8.1. Durchführung 34
2.16.8.2. Verwendete Laufmittel 35
2.16.8.3. Nachweis der Lipidkomponenten . . 35
2.16.8.4. Halbquantitative Bestimmung der Lipidzusammensetzung 35

2.17. Dichtemessungen an Lipiden 35

2.17.1. Meßprinzip 35
2.17.2. Probenvorbereitung 37

2.18. Differentialkalorimetrie 37

2.18.1. Meßprinzip 37
2.18.2. Aufbau des Gerätes 38
2.18.3. Probenvorbereitung und Messung . . 38

3. ERGEBNISSE

3.1. Temperatur- und pH-Einfluß auf das Fettsäuremuster bei Bacillus acidocaldarius . . . 39

3.2. Temperatur- und pH-Abhängigkeit des Fettsäuremusters bei Brevibacterium pusillum . 42

3.3. Strukturanaloge von Cyclohexancarbonsäure 44

3.4. Mutanten aus dem ersten Screening 48

3.4.1. Mutantenscreening 48
3.4.2. Charakterisierung der Mutante 13 . 50
3.4.2.1. Wachstum mit Cyclohexancarbonsäure 50
3.4.2.2. Wachstum der Mutante auf Hefeextrakt 51
3.4.2.3. Verwertung verschiedener Fettsäure-Vorstufen 57
3.4.2.4. Wachstum der Mutante bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen 58
3.4.2.5. Resistente gegen Azaleucin 59
3.4.2.6. Atmungsrate der Mutante 13 60
3.4.2.7. ATP-Bestimmungen 63
3.4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse von Mutante 13 64

3.5. Mutanten aus dem zweiten Screening 65

3.5.1. Zweites Mutantenscreening 65
3.5.2. Shikimisäureauxotrophe Mutanten . 67
3.5.3. Kreuzfütterung 68

3.5.4. Wachstum auf verschiedenen Fettsäurevorstufen 70
3.5.5. Wachstum bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen 77
3.5.6. Hopanoidgehalt der Mutanten 82
3.5.7. Physikochemische Untersuchungen . . 89
3.5.7.1. Dichtemessungen 89
3.5.7.2. Differentialkalorimetrie 92
3.5.8. Versuche mit membranaktiven Agenzien 95
3.5.8.1. Alkohole 95
3.5.8.2. Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon 96
3.5.8.3. Detergenzien 97
3.5.9. Temperaturschockversuche 98
3.5.10. Transportmessungen 101
3.5.10.1. Lysintransport 101
3.5.10.2. Glutaminsäuretransport 106
3.5.10.3. Desoxyglucosetransport 108
3.5.11. Messung der Atmungsrate 111
3.5.12. Hemmstoffe der Sterolsynthese . . . 114
3.5.12.1. Compactin 114
3.5.12.2. AMO 1618 115
3.5.12.3. Azasqualene 116
3.5.13. Zusammenfassung der Ergebnisse mit den Mutanten aus dem zweiten Screening 118

4. DISKUSSION 120
4.1. Strukturanaloge von Cyclohexancarbonsäure 123
4.2. Mutantenscreening 124
4.3. Wachstum auf Fettsäurevorstufen 125
4.4. Wachstum bei verschiedenen Umweltbedingungen 129
4.5. Azaleucinresistente Mutanten 131
4.6. Messung der Atmungsrate und des ATP-Gehaltes der Mutante 13 132
4.7. Hopangehalt 135
4.8. Physikochemische Untersuchungen 142
4.9. Wirkung membranschädigender Agenzien . . . 144
4.10. Temperaturschockversuche 146
4.11. Transportexperimente 147
4.12. Hemmstoffe der Steroidbiosynthese 151
4.13. Abschlußdiskussion 152

5. ZUSAMMENFASSUNG 154

6. LITERATUR 156

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

ai-, anteiso-FS	anteisoverzweigte Fettsäuren
AS	Aminosäure(n)
B.	Bacillus
Br.	Brevibacterium
BSA	Rinderserumalbumin
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
Chc	Cyclohexancarbonsäure
Cheptc	Cycloheptancarbonsäure
Chept-FS	ω-Cycloheptanfettsäure
Ch-FS	ω-Cyclohexanfettsäure
Cpc	Cyclopentancarbonsäure
Cp-FS	ω-Cyclopentanfettsäuren
DC	Dünnschichtchromatographie
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DPG	Diphosphatidylglycerol
EMS	Methylsulfonsäureethylester
FS	Fettsäure
g	Fallbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
Gen/h	Generation pro Stunde
Gl	Glycolipid
i-, iso-FS	isoverzweigte Fettsäure
MG	Molekulargewicht
MM	Glucoseminimalmedium
NG	1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin
OD	Optische Dichte
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
TG	Trockengewicht
THBH	Tetrahydroxybacteriohopan
WT	Wildtyp
Z.	Zymomonas

1. EINLEITUNG

Die biologische Membran ist eine der wichtigsten "Erfindungen" im Verlaufe der Entwicklung des Lebens. Dies dokumentiert sich durch ihr ausnahmsloses Vorhandensein bei allen Formen des Lebens, angefangen von den einfachsten Prokaryonten bis hin zu hochentwickelten Vielzellern. Mit ihrer Hauptfunktion, lebende Systeme gegenüber ihrer Umwelt abzugrenzen, verhalf sie wahrscheinlich schon den ersten Anfängen von Leben, sich auf der noch jungen Erde zu behaupten. Zu dieser Funktion sind im Verlaufe der Phylogenie weitere Aufgaben getreten, die zum Teil gegensätzlicher Natur sind.
Die Biomembran muß einerseits dicht genug sein, um das Ionenmilieu und den Energetisierungszustand der Zelle zu erhalten, andererseits muß sie es den in einem dynamischen Fließgleichgewicht befindlichen Lebewesen ermöglichen, Nährstoffe selektiv aufzunehmen und Abfallprodukte abzugeben. Membrangebunden ist die Energiekonservierung und damit auch zumindest bei einzelligen Organismen die Motilität. Die Biomembran dient der Signalaufnahme und Weiterleitung, sichert damit den Kontakt mit der Umwelt; sie ist Träger einer Vielzahl extrazellulärer Strukturen, die z.B. den Zellen eines vielzelligen Organismus ihre Individualität verleihen sowie die Basis der Immunität darstellen.
Es stellt sich die Frage, welches Bau- und Funktionsprinzip diesen vielfältigen, oft konträren Anforderungen gerecht wird.
Die biologische Membran setzt sich aus zwei Gruppen von Biomolekülen zusammen: den Lipiden und den Proteinen.
1925 extrahierten GORTER und GRENDEL aus einer bekannten Zahl von Erythrozyten die Lipide und maßen deren Fläche auf einer Langmuir-Filmwaage. Da die Fläche etwa die doppelte Erythrozytenoberfläche umfaßte, postulierten sie, daß die Erythrozytenmembran von einem bimolekularen Lipidfilm umgeben ist. Der nächste Schritt war das Membranmodell von

DANIELLI und DAVSON (1935), die die Membran als bimolekularen Film mit beiderseitiger Proteinschicht sahen. Dieses Bild stand in Einklang mit den damals aufkommenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Das heute allgemein anerkannte Fluid-mosaic-Modell von SINGER und NICHOLSON (1972) ist immer noch mit den heute vorhandenen Daten im Einklang. Danach sind die Proteine entweder in eine bimolekulare Lipidschicht eingelagert (integrale Proteine) oder an diese angelagert (periphere Proteine). Die Lipide stellen also eine Matrix, ein Gerüst dar, in dem die Proteine aufgrund verschiedener Arten von Wechselwirkungen in einer ganz bestimmten Lage und Orientierung angeordnet sind. Der chemische Aufbau der Lipide folgt einem bei allen Organismen vorhandenem allgemeinen Bauprinzip: Sie bestehen aus einem hydrophilen und einem lipophilen Anteil. Der lipophile Teil entspricht zwei bis drei Kohlenwasserstoffketten, die etwa 14 bis 20 C-Atome umfassen und meistens an Glycerin, bei Eukaryonten auch an Sphingosin gebunden sind. Der hydrophile Anteil ist ein polarer Phosphorsäurerest oder ein Zucker. Durch diesen Aufbau zeichnen sich die Lipide als amphiphile Moleküle aus und neigen in wässeriger Lösung im wesentlichen aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung zu übermolekularer Selbstorganisation. Je nach der räumlichen Struktur der Lipidmoleküle bilden sich kugelförmige Mizellen, Bilayer (jeweils der hydrophobe Teil innen) oder invertierte Mizellen (hexagonale H_{II}-Phasen, hydrophiler Teil innen, GRUNER 1975). Die häufigste physiologische Form ist der Bilayer, so daß man davon ausgehen kann, daß die Membranbildung ein Self-assembly-Prozeß ist.

Die strukturelle Zusammensetzung der Lipide ist selbst bei Eubakterien erstaunlich vielfältig (GOLDFINE 1982). Der weitaus häufigste Typ sind die Acylglycerole, bei denen Glycerin in 1,2-Stellung mit Fettsäuren verestert ist. Seltener kommen Plasmalogene (Aldehyd in 1-Position) und Alkylglycerole (ein oder zwei ethergebundene Fettalkohole) vor. Die Entdeckung der Archaebakterien liefer-

te eine völlig neue Klasse von Lipiden. Es handelt sich hier um Isoprenoidseitenketten, die über Etherbindungen mit Glycerol verknüpft sind (LANGWORTHY 1985, DE ROSA et al. 1986). Im Falle der Tetraether sind diese sogar membranüberspannend, so daß man von einem Monolayer sprechen muß. In jüngster Zeit wurde eine weitere neue Gruppe von Membranlipiden gefunden (POND et al. 1986). Es sind dies langkettige glycerinfreie Diole, die die Hauptlipidkomponente in einem thermophilen gramnegativen Eubakterium darstellen. Eine letzte große Gruppe bakterieller Lipide sind die Triterpene, deren wichtigste Vertreter, die Hopanoide, lange Zeit nur aus Erdölfraktionen und Sedimenten bekannt waren (OURISSON et al. 1979), Ende der 70er Jahre jedoch nach und nach in etwa 50% der untersuchten Mikroorganismen gefunden wurden (ROHMER et al. 1984). Da Steroide in Prokaryonten nahezu völlig fehlen, werden Hopanoide als deren bakterielle Analoge angesehen (ROHMER et al. 1979). Angesichts der Tatsache, daß sehr viele Mikroorganismen noch auf ihre Entdeckung warten, kann zukünftig mit weiteren Überraschungen auf dem Lipidsektor gerechnet werden.

Während man über die Funktion der Membranproteine in manchen Fällen recht gut Bescheid weiß, als Beispiel wären hier Bakteriorhodopsin, Photosynthese-, Atmungsenzyme, ATPasen und Carrier zu nennen, ist über die Funktion von Lipiden noch wenig bekannt, zumindest, was deren Rolle im komplexen biologischen System angeht. Eine biologische Membran kann mit Variation der Fettsäuren 100 verschiedene Lipide enthalten. Da jedoch ein Bilayer prinzipiell aus einer einzigen Sorte von Lipiden gebildet werden kann, müssen den Lipiden noch andere funktionelle Rollen zugeordnet werden können, anders läßt sich diese Vielfalt sonst nicht erklären.

Obwohl der physikalische Gesamtzustand der Membran für die Funktion der Proteine eine wichtige Rolle spielt (BENGA & HOLMES 1984), gibt es nur wenige Informationen über die spezifische Funktion ganz bestimmter Lipide. Nach dem Fluid-mosaic-Modell von SINGER und NICHOLSON (1972) ist

die Membran mit einer mehr oder weniger viskosen, zweischichtigen Flüssigkeit zu vergleichen, in der die Lipide und Proteine in lateraler Richtung diffundieren können (PARDEE 1971, GULICK-KRZYWICKI 1975). Die Annahme, daß Proteine von einer relativ festen ein- bis zweimolekularen Schicht von Lipiden umgeben sind ("boundary-lipids", "annular lipid") ist durch den in neueren Arbeiten bestätigten raschen Austausch von Lipiden zwischen "boundary-" und "bulk-phase" unter Kritik geraten und kann in dieser Form nicht mehr aufrechterhalten werden (CULLIS & KRUIFF 1979). Des weiteren hat sich gezeigt, daß manche integralen Membranproteine zwar lipidabhängig sind, daß aber verschiedene Phospholipide das Funktionieren dieser Proteine bewirken können; offenbar ist eher die Ladung und Struktur der Kopfgruppen entscheidend als der Lipidtyp (WARREN et al. 1975, YU et al. 1975).
Es gibt Hinweise, daß gewisse Lipide, wie z.B. Phosphatidylethanolamin, und Interaktionen von Lipiden mit Ca^{++} das Auftreten von Nichtbilayerphasen in biologischen Membranen fördern, was neue Aspekte zu bisher unverstandenen Vorgängen wie Membranfusion, Vesikelabschnürung, Molekülaustausch zwischen den Bilayerhälften liefert (CULLIS & KRUIJFF 1979). Versuche mit Phospholipidmutanten von E. coli zeigen, daß selbst ein Organismus, der nur drei verschiedene Phospholipide in seiner Membran hat, enorme Schwankungen in den Mengenverhältnissen dieser Komponenten vertragen kann, ohne seine Vitalität unter den üblichen Laborbedingungen einzubüßen, und damit auch mit Hilfe dieser Mutanten nicht auf spezifische Funktionen einzelner Lipide geschlossen werden kann (PLUSCHKE et al. 1978, HAWROT & KENNEDY 1978, SHIBUYA et al. 1985). Ein etwas detaillierteres Bild ergab sich über die Sterolbedürfnisse von Hefemutanten (RODRIGUEZ et al. 1985). Hier konnten mindestens vier verschiedene Funktionsebenen für Sterole abgeleitet werden, wobei Ergosterol für Hefezellen in sehr geringen Mengen essentiell ist (synergistischer Effekt), seine Rolle aber immer noch unbekannt ist; möglicherweise wirkt es als Cofaktor.

Der weitaus größte Teil an Informationen über Eigenschaften und Funktion von Membranlipiden stammt aus biophysikalischen Messungen an Modellmembranen und auch an ganzen Organismen. Durch die Fähigkeit zur Selbstorganisation im wässerigen System ist es relativ leicht, Lipidmembranen mit definierter einfacher Zusammensetzung herzustellen. An solchen Bilayern konnte durch Differentialkalorimetrie nachgewisen werden, daß Lipide je nach ihrer Zusammensetzung bei unterschiedlichen Temperaturen einen Phasenübergang vom Gelzustand in den flüssigkristallinen Zustand durchmachen (CHAPMAN et al. 1967). Der Vorgang wurde bald darauf an bakteriellen Lipiden bestätigt (STEIM 1968) sowie an intakten Acholeplasma-laidlawii-Zellen nachgewiesen (REINERT & STEIM 1970, MELCHIOR et al. 1970). Unterhalb der Phasenumwandlung befinden sich die Lipidmoleküle im Gelzustand, die Acylketten sind, etwas geneigt zur Senkrechten der Membranfläche, parallel zueinander in gestreckter Form angeordnet und relativ unbeweglich. Bei Temperaturerhöhung wird die Phasenumwandlung durch eine Konformationsänderung der Ketten ausgelöst, sie stellen sich senkrecht zur Membranoberfläche, ihr Flächenbedarf wird kleiner, und sie sind relativ frei beweglich in der Membranebene. Im flüssigkristallinen Zustand ist die Membran ca. 15% dünner als im Gelzustand; die Acylketten der beiden Bilayerhälften müssen entweder an ihren Methylenden miteinander verzahnt oder umgebogen bzw. gefaltet sein, ihre Beweglichkeit ist größer und nimmt mit steigender Temperatur immer mehr zu (MELCHIOR 1982). Um die Lipiddynamik zu beschreiben, wurde der Begriff Membranfluidität geprägt. Er umfaßt einerseits die Diffusion des ganzen Moleküls als auch die Rotation von C-C-Bindungen und die Orientierung einzelner C-Atome in der Kette.

Die Phasenübergangstemperatur ist abhängig von der Art der Kopfgruppe, im wesentlichen jedoch vom Fettsäureteil der Lipide. Gemäß den Schmelzpunkten haben Lipide mit ungesättigten oder anteisoverzweigten Fettsäuren niedrigere Übergangstemperaturen als solche mit isoverzweigten oder geradkettigen Fettsäuren. Lipidgemische, wie sie in biologischen Membranen vorkommen, zeigen aufgrund der unterschiedlichen Umwandlungstemperaturen der einzelnen Komponenten breite Phasenübergänge; beim Übergang in die Gel-

phase treten Entmischungen, sogenannte laterale Phasentrennungen, auf.
Die weiteren Forschungen befaßten sich mit der Frage, in welchem Phasenzustand sich biologische Membranen bei physiologischen Temperaturen befinden. Die erste Antwort kam von ESSER & SOUZA (1974), nach der die Temperaturobergrenze für ein Bakterium durch das vollständige Vorliegen der Lipide in der flüssigkristallinen Phase bestimmt wird. Dies wurde widerlegt durch die Arbeit von MC ELHANEY & SOUZA (1976), in der gezeigt wurde, daß Bakterien sehr wohl oberhalb des Endes des Phasenüberganges wachsen können. Weitere Arbeiten über die Lebensfähigkeit von Bakterien in Abhängigkeit vom Phasenzustand der Lipide wiesen sowohl auf eine untere als auch auf eine obere Grenze der Membranfluidität hin. Acholeplasma laidlawii benötigt mindestens 10% der Lipide im flüssigkristallinen Zustand, bei 50% setzt optimales Wachstum ein (MC ELHANEY 1974). E. coli wächst ebenfalls nur, wenn wenigstens 5-10% der Lipide oberhalb des Überganges vorliegen (STEIM 1970, MELCHIOR & STEIM 1976). Eine Mutante von Bacillus stearothermophilus, die den Phasenübergang nicht höher als 40°C legen kann, wächst im Gegensatz zum Wildtyp nur bis 60°C (MC ELHANEY & SOUZA 1976). Wärmeadaptierte Zellen von Yersinia enterolytica wachsen bei 45°C, kälteadaptierte nicht (ABBAS & CARD 1980). Aufgrund dieser Beobachtungen ergibt sich für ein Bakterium, das in einem gewissen Temperaturbereich wachsen kann, die Notwendigkeit, den Zustand seiner Membran den sich wechselnden Temperaturverhältnissen in der Umwelt anzupassen.
SINENSKY (1974) nannte dieses Prinzip die "homeoviskose Adaption". Die Organismen regulieren ihren Membranzustand derart, daß bei jeder Wachstumstemperatur eine für die Membranfunktion optimale Fluidität erreicht wird. Dieser Optimalbereich liegt für die untersuchten Bakterien am oberen Ende des Phasenüberganges, bzw. eher im total flüssigkristallinen Zustand. Reguliert wird die Membran-

fluidität im wesentlichen über die Änderung des Fettsäuremusters. Als Anpassung an verschiedene Umwelttemperaturen werden Fettsäuren mit unterschiedlichen Schmelzpunkten in die Lipide eingebaut. Hier bieten sich angesichts der bei Mikroorganismen vorkommenden verschiedenen Fettsäuretypen unterschiedliche Möglichkeiten an. E. coli reguliert die Fluidität über das Verhältnis von geradkettigen gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren (DE MENDOZA & CRONAN 1983, OH-HASHI & OKUYAMA 1986).
Micrococcus cryophilus fluidisiert die Membran durch den Einbau kurzer geradkettiger Fettsäuren (SANDERCOCK & RUSSEL 1980). Bei verschiedenen Bacillus-Arten wurde eine mehrfache Regulation gefunden bei Temperaturabsenkung (FULCO & FUJII 1980): erstens durch eine schnelle Hyperinduktion einer Desaturase, wodurch bereits existierende Fettsäuren verändert werden und zweitens durch die langsamere Neusynthese von Anteisofettsäuren als Ersatz für Isofettsäuren mit höheren Schmelzpunkten. Das Vorhandensein unterschiedlicher Fettsäuretypen und damit auch verschiedener Temperaturadaptionsmechanismen in einem Organismus läßt auf eine sehr genaue und feinfühlige Fluiditätsanpassung der Membran schließen, die letztendlich einen optimalen Membranzustand sowie eine für die Aktivität der Membranproteine günstige Umgebung sichert.
Neben den bereits erwähnten Fettsäuren gibt es solche, die Ringstrukturen in der Kette aufweisen und deren Funktion nicht so klar definiert werden kann. Diese Moleküle treten als Cyclopropanfettsäuren bei manchen gramnegativen und grampositiven Organismen (CULLEN et al. 1971) und als ω-Cyclohexanfettsäuren bzw. ω-Cycloheptanfettsäuren bei thermoacidophilen Bacillus-Arten auf (DE ROSA et al. 1974, PORALLA & KÖNIG 1982).
Da die letztgenannten Fettsäuren als Hauptkomponenten in den Membranlipiden von thermoacidophilen Mikroorganismen anzutreffen sind, könnte man den Schluß ziehen, daß sie eine Anpassung darstellen an die extremen Umweltbedingungen, bei denen diese Organismen leben. In diesem Zusammenhang ist auch das Vorliegen von großen Mengen Cyclopropanfettsäuren bei den acidophilen Thiobacillen zu erwähnen

(LANGWORTHY 1978).
In der vorliegenden Arbeit wird versucht, diese Annahme zu überprüfen, bereits vorhandene Ergebnisse durch weitere Untersuchungen zu untermauern und damit einen Beitrag zum Verständnis der Funktion einzelner Membrankomponenten zu liefern. Der verwendete Organismus ist Bacillus acidocaldarius, ein grampositives, bewegliches sporenbildendes Stäbchen. Es wurde zunächst aus heißen Quellen an verschiedenen Orten isoliert (UCHINO & DOI 1967, DARLAND & BROCK 1971, DE ROSA et al. 1971). Inzwischen wurden aber auch verwandte Arten aus normalen Erdböden gewonnen (HIPPCHEN et al. 1981). Das optimale Wachstum findet bei pH 3 und 60°C statt, die Stämme aus Erdböden haben ihr Optimum bei etwas gemäßigteren Bedingungen (DEINHARD 1983).
MICHELS & BAKKER (1985) zeigten, daß der intrazelluläre pH-Wert von B. acidocaldarius bei etwa 6,7, also nahe dem Neutralpunkt, liegt. Die Konsequenz für den Organismus ist angesichts des niederen pH-Wertes im Außenmedium ein hoher Protonengradient über der Membran. Obwohl, wie bei allen acidophilen Organismen (KRULWICH & GUFFANTI 1983, COBLEY & COX 1983), das Membranpotential innen positiv ist, fordert der hohe pH-Gradient besondere Qualitäten der Cytoplasmamembran, um das unkontrollierte Eindringen von Protonen zu verhindern. In der Tat besteht die Membran bei B. acidocaldarius aus einer Kombination ungewöhnlicher Lipide (Abb. 1, Tab. 1). Neben den bereits erwähnten ω-Cyclohexanfettsäuren mit Kettenlängen von C 17 und C 19 kommen in geringen Mengen verzweigte und geradkettige Fettsäuren vor (C 14 bis C 18). Dominierende Lipide sind Glycolipide, darunter ein Hopan-Glycolipid, das 1(O-β-N-Acyl-glucosamyl)-2,3,4-Tetrahydroxypentan-29-hopan sowie das zuckerfreie Lipid Tetrahydroxybacteriohopan (THBH). Auffällig bei den sauren Lipiden ist ein schwefelhaltiges Lipid, das bislang nur aus allen bisher untersuchten Chloroplasten bekannte 6-Sulfonoquinovosyldiacylglycerol. Der stark sauren Schwefelgruppe dieses Lipids wird eine Rolle beim Protonenausschluß aus dem Zellinneren zugewiesen (LANGWORTHY et al 1976, LANGWORTHY 1978).

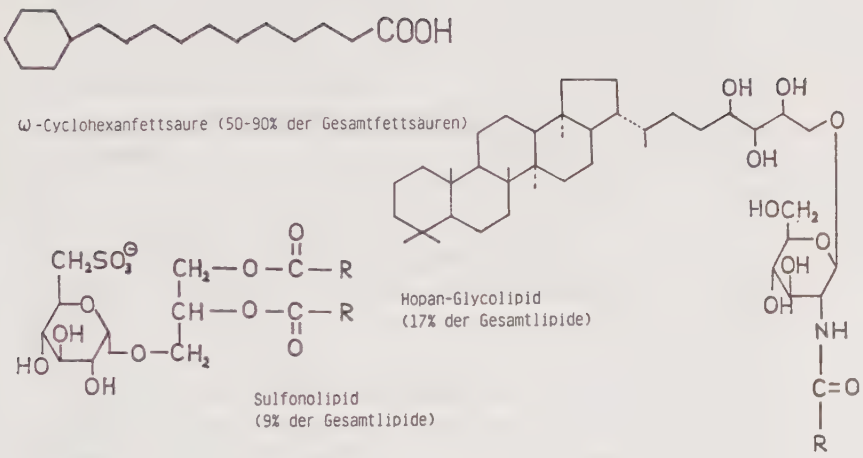


Abb. 1: Membranlipide aus B. acidocaldarius, R = Fettsäure.

Tab. 1: Mengenverhältnisse der verschiedenen Lipide bei B. acidocaldarius (nach LANGWORTHY et al. 1976).

Substanz	% Gesamtlipide	
Neutrale Lipide	15,7	
Glycolipide	64,0	% Glycolipide
THBH	0,9	1,5
THBH-Gl	16,7	26,1
Diacylglycerol-Gl	15,9	24,9
Monoacylglycerol-Gl	26,5	41,3
Rest	4,0	6,3
Phospholipide	11,5	% Phospholipide
Diphosphatidylglycerol	6,5	56,7
Lyso- "	1,1	9,4
Phosphatidylglycerol	2,7	23,5
Rest (Phosphatidylethanolamin)	1,2	10,4
Sulfonolipid	8,8	

Da sich die Fluidität der Membranlipide proportional mit der Temperatur erhöht (LANDS & DAVIS 1984) und die Protonendurchlässigkeit mit der Membranfluidität ansteigt (ROSSIGNOL et al. 1982), müßte man für die Lipide von thermoacidophilen Bakterien Eigenschaften fordern, die die Fluidität der Lipidphase im flüssigkristallinen Zustand auch bei höheren Temperaturen in Grenzen halten.

Von den Hopanen konnte gezeigt werden, daß sie in Modellsystemen eine dem Cholesterin analoge Wirkung aufweisen (KANNENBERG et al. 1985, PORALLA et al. 1980, KANNENBERG et. al. 1983). Vor allem THBH kondensiert flüssigkristalline Bilayer, allerdings in etwas geringerem Maße als Cholesterin. Die Permeabilität von Liposomen ist in Gegenwart von THBH vermindert, was für eine dichtere, weniger fluide Membran spricht (KANNENBERG et al. 1985). Von BENZ et al. (1983) konnte an Bilayermembranen eine Erhöhung der Mikroviskosität, besonders in Verbindung mit Cyclohexanfettsäuren, festgestellt werden.

Physikochemische Untersuchungen an Phosphatidylcholinen mit Cyclohexanfettsäuren ergaben ebenfalls einen kondensierenden Effekt. Die Modellipide zeigten einen höheren Ordnungsgrad und eine geringere Fluidität im flüssigkristallinen Membranzustand, verglichen mit anderen Phospholipiden (BENZ et al. 1983, KANNENBERG et al. 1984, SUNAMOTO et al. 1982). Eine verminderte Permeabilität oberhalb des Phasenüberganges gegenüber kleinen Molekülen war gleichfalls zu beobachten (ENDO et al. 1982, KANNENBERG et al. 1985). Erklären läßt sich dies mit den verstärkten hydrophoben Wechselwirkungen im Bereich der Ringe sowie der eingeschränkten Beweglichkeit der Acylketten gegeneinander durch die voluminösen Endgruppen, was zumindest in der Bilayermitte einen erhöhten Ordnungsgrad erwarten läßt. Andererseits bewirken die voluminösen Endgruppen einen verringerten Ordnungsgrad im Gelzustand, verglichen mit isoverzweigten oder geradkettigen Fettsäuren (LEWIS & MC ELHANEY 1985). Zusammenfassend läßt sich aus den an Modellsystemen gewonnenen

Erkenntnissen der Schluß ziehen, daß Hopane und ω-Cyclohexanfettsäuren Membraneigenschaften fördern, die für das Leben bei hohen Temperaturen und Protonenkonzentrationen essentiell sind.
Daß Cyclohexanfettsäuren inzwischen auch bei einem mesophilen Bakterium gefunden wurden (SUZUKI et al. 1981), muß nicht unbedingt einen Widerspruch darstellen, da einerseits eine deutliche Temperaturabhängigkeit des Gehaltes an cyclischen Fettsäuren vorhanden ist, andererseits der Organismus eine ökologische Nische besiedeln kann, in der ihm die Cyclohexanfettsäuren Vorteile bringen.
Eine gute Bestätigung des hier vertretenen Konzepts kommt von den Lipiden der Archaebakterien. Unter den dort dominierenden Etherlipiden zeichnen sich die thermoacidophilen Vertreter der Archaebakterien Sulfolobus und Thermoplasma durch den Besitz von Tetraethern mit internen Cyclopentanringen aus, deren Cyclisierungsgrad mit der Temperatur steigt (DE ROSA et al. 1976, 1980, FURUYA et al. 1980, LANGWORTHY et al. 1982). Dadurch ändert sich die Kettenlänge, der Ordnungsgrad, die Fluidität und die Dichte des Membraninneren. Angesichts einer derartigen Konvergenz bei verwandtschaftlich völlig verschiedenen Organismen ist die vorteilbringende Funktion cyclischer Lipidstrukturen bei thermoacidophilen Bakterien kaum noch zu bezweifeln.
Nach den umfangreichen Messungen an Modellsystemen wird in der vorliegenden Arbeit die Funktion der Cyclohexanfettsäuren am intakten Organismus untersucht. Dies erfolgt im wesentlichen an cyclohexanfettsäureauxotrophen Mutanten, deren Verhalten unter verschiedenen Versuchsbedingungen weiteren Aufschluß über die Bedeutung einzelner Membrankomponenten liefern soll. In einer Fettsäuremutante von Bacillus subtilis konnte durch Füttern entsprechender Fettsäurevorstufen ein Fettsäuremuster wie bei B. acidocaldarius erzeugt werden (DREHER et al. 1976). Es konnte jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen

cyclischen Fettsäuren und der Toleranz gegenüber erhöhten Temperaturen und niedrigen pH-Werten festgestellt werden (BLUME et al. 1979). Da die beiden Organismen bezüglich der Lipidzusammensetzung mit Ausnahme der Fettsäuren kaum Gemeinsamkeiten aufweisen, ist es sicher sinnvoll, die Funktion cyclischer Fettsäuren an Bacillus acidocaldarius direkt zu studieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. CHEMIKALIEN

Soweit nicht gesondert aufgeführt, handelt es sich um analysenreine Chemikalien und Produkte der Firma Merck AG, Darmstadt.

Von Difco Laboratories, Detroit, Mich.:
Bacto-Yeast-Extract, Bacto-Agar, Bacto-Pepton.

Von Maizena GmbH., Heilbronn:
D-Glucose-Monohydrat

Von Bio-Rad Laboratories, Richmond, Cal.:
Biogel P 2

Von Applied Science Laboratories Inc., Inglewood, Penna.:
BC-Mix L, Mix L-206, Mix K-102.

Von Roth, Karlsruhe:
Shikimisäure

Von Bayer AG, Leverkusen:
Binotal (= Ampicillin)

Von Hoechst AG, Frankfurt:
Novobiocin

Von Grünenthal Chemie, Stolberg:
Penicillin

Von Fluka, Neu-Ulm:
Cyclamat

Von Serva, Heidelberg:
Cetyltrimethylammoniumbromid, Methylsulfonsäureethylester, Natriumdodecylsulfat.

Von Ega-Chemie, Steinheim:
Adamantancarbonsäure, p-Aminobenzoesäure, Camphansäure, Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon, Cyclohexancarbonsäureamid, Cyclohexan-1,4-dicarbonsäure, Cyclohexanon-2-carbonsäureethylester, 2-Cyclopentenessigsäure, Bromfuran-2-carbonsäure, p-Brommethylbenzoesäure, Dicyclohexylcarbodiimid, 1-Methyl-1-cyclohexancarbonsäure, 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin, 5-Nitrofuran-2-carbonsäure, Piperidin-2-carbonsäure, Norbonylessigsäure, trans-4-(Aminomethyl)-cyclohexancarbonsäure, Cyclohexanisocyanat, Cyclohexanformamid.

Von Sigma, München:

Azaleucin, 2,3-Dihydrobenzoesäure, 2-Desoxyglucose, α-Ketoisocaproat, α-Ketoisovalerat, Rinderserumalbumin, α-Keto-β-methylvalerat.

Von Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, Cal.:

4,6-Dioxoheptansäure.

Von Amersham International, Buckinghamshire:

2-Desoxy-D-(1-^{14}C)Glucose.

Von Zinsser, Frankfurt (CEA):

L-(^{14}C) Glutaminsäure, L-(^{14}C) Lysin.

Von Dr. H. Eibl, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen:

1-Octadecanyl-glycerol

Von Dr. K. Gekeler, Institut für Org. Chemie, Tübingen:

3-Brom-cyclohexancarbonsäure, Cyclohexansulfonsäure, Cyclohexansulfonamid, Cyclohexanhydroxamsäure, Cyclohexancarbonsäurehydrazid, 4-Jod-cyclohexancarbonsäure, Methylcyclohexylketon, Sulfinsäure.

Von Prof. H.G. Floss, Department of Chemistry, Ohio State University, Columbus:

Cyclohexen-1-carbonsäure, Cyclohexen-2-carbonsäure, Cyclohexen-2,4-carbonsäure.

Von Dr. L. Cattel, Instituto di Chimica Farmaceutica Applicata, Torino:

Azasqualene.

Von M. Rohmer, Ecole Nationale Supérieure de Chimie, Mulhouse

Azasqualen.

Von A. Endo, Department of Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo Noko University, Tokyo:

Compactin.

2.2. VERWENDETE ORGANISMEN

Bacillus acidocaldarius ATCC 27009, von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, identisch mit 104-1A (DARLAND & BROCK 1971).

Brevibacterium pusillum ATCC 20527, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, identisch mit Curtobacterium pusillum (SUZUKI et al. 1981).

Zymomonas mobilis ATCC 10988, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

2.3. NÄHRMEDIEN

2.3.1. Flüssigmedien

Sporulationsmedium für Bacillus acidocaldarius (DARLAND & Brock 1971), abgeändert:

0,4	g $(NH_4)_2SO_4$	Spurenelemente:	
0,25	g $CaCl_2 \times 2H_2O$	0,28	g $FeSO_4 \times 7H_2O$
0,5	g $MgSO_4 \times 7H_2O$	1,25	g $MnCl_2 \times 4H_2O$
3,0	g KH_2PO_4	0,48	g $ZnSO_4 \times 7H_2O$
3,0	g Glucose	1 l	entionisiertes Wasser
1,0	g Hefeextrakt		
1 ml	Spurenelemente		
1 l	entionisiertes Wasser		

Synthetisches Medium für B. acidocaldarius (Minimalmedium MM):

Es unterscheidet sich vom Sporulationsmedium durch das Fehlen des Hefeextraktes und Zugabe von 4 g anstatt 3 g Glucose/l.

Die Fettsäurevorstufen für die Mutanten wurden aus einer sterilen Stammlösung (entsprechender pH-Wert eingestellt) vor dem Animpfen der Kulturen dem Medium zugesetzt.

Aminosäurestammlösung: 800 mg Leucin, 400 mg Isoleucin, 400 mg Valin in 50 ml entionisiertem Wasser, eingesetzte Menge: 12 ml/l Medium.

Cyclohexancarbonsäure-Stammlösung: 100 mg Cyclohexancarbonsäure in 50 ml entionisiertem Wasser, eingesetzte Menge: 9 ml/l Medium.

Die Konzentrationen der weiteren Medienzusätze (Hemmstoffe, Vorstufen) werden bei der Erörterung der einzelnen Versuche erwähnt.

Medium für Brevibacterium pusillum (DSM-Katalog):

10 g Casein Pepton (tryptisch verdaut)
5 g Hefeextrakt
5 g Glucose
5 g NaCl

Medium für Zymomonas mobilis (DSM-Katalog):

5 g Hefeextrakt
1 g KH_2PO_4
1 g $(NH_4)_2SO_4$
0,5 g $MgSO_4 \times 7H_2O$
20 g Glucose
1 l entionisiertes Wasser
pH-Wert 5

Der pH-Wert der Medien wurde vor dem Autoklavieren mit 6 bzw. 0,5 N H_2SO_4 sowie 4 und 1 N NaOH bei Raumtemperatur eingestellt. Die jeweiligen pH-Werte werden bei den einzelnen Versuchsbeschreibungen angegeben.

2.3.2. Feste Medien

Zur Herstellung von Agarplatten wurden gleiche Mengen doppelt konzentriertes Medium und doppeltkonzentrierte Agarlösung nach dem Autoklavieren in ca. 50°C warmem Zustand vermischt und jeweils ca. 30 ml in Kunststoffpetrischalen ausgegossen.
Die Endkonzentration des Agars war 2%.
Die fertigen Platten wurden übereinander gestapelt und ein bis zwei Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Platten stapelweise in Kunststoffbeutel verpackt und bei Zimmertemperatur, oder über längere Zeit im Kühlschrank, gelagert.

2.3.3. Waschflüssigkeiten

2.3.3.1. Salzlösung

Die Salzlösung wurde zum Waschen von geernteten Zellen verwendet. Zusammensetzung: 8 g NaCl, 1 g $MgSO_4$ x $7H_2O$, 1 l entionisiertes Wasser, pH 5.

2.3.3.2. Synthetisches Medium

Zusammensetzung wie bei 2.3.1., je nach Versuchsbedingungen mit und ohne Glucose. Das synthetische Medium wurde zum Waschen von Zellen, die für weitere Versuche eingesetzt wurden und für Verdünnungsreihen verwendet. Bei Verwendung des synthetischen Mediums als Waschflüssigkeit ergibt sich eine geringere Belastung der Zellen als bei Verwendung von Salzlösungen oder Puffergemischen mit anderen Ionenkonzentrationen und ohne C-Quelle.

2.4. KULTURBEDINGUNGEN UND WACHSTUMSKONTROLLE

2.4.1. Schüttelkulturen

Flüssigkulturen wurden in Schikanekolben mit 20 bis 30% Füllung auf temperierbaren Wasserbadschüttelmaschinen vom Typ "New Brunswick Model 676" und "Infors HTR 1", beide ca. 140 U/min, oder auf der warmluftbeheizten Schüttelmaschine "Infors RC 1 Tk" (110 U/min) inkubiert. Angeimpft wurde in der Regel mit einer Impföse voller Zellen von einer wachsenden Plattenkultur.

2.4.2. Fermentation

20 l Glasfermenter, Modell C 6 der Firma Biolafitte, wurden mit 5 bis 17 l Medium gefüllt und 30 min bei 134°C autoklaviert. Angeimpft wurde nach Einstellen der entsprechenden Inkubationstemperatur mit 200 - 600 ml einer gut wachsenden Vorkultur und bei 300 U/min (Blattrührer) Rührerdrehzahl und ca. 30 l Luft/min fermentiert. Der Fermenter wurde unter pH-statisierten Bedingungen betrieben, mit einer autoklavierbaren Ingold pH-Elektrode und einer Metrohm pH-Regelung. Der pH-Wert wurde mit 0,5 N H_2SO_4 und 0,5 N NaOH geregelt.

2.4.3. Plattenkulturen

Die beimpften Platten wurden bei den entsprechenden Temperaturen in Brutschränken vom Typ "Heraeus B 5042 E" bebrütet. Um das allzu rasche Austrocknen der Platten zu verhindern, wurden sie stapelweise entweder in Kunststoffsäcke verpackt oder mit 1-l-Bechergläsern abgedeckt.

2.4.4. Messung der optischen Dichte (OD)

Zur Kontrolle des Wachstums wurden den Kulturen steril Proben entnommen, deren optische Dichte bei 578 nm, Spaltbreite 1 x 4, auf einem Photometer Typ "1101 M" der Firma Eppendorf gemessen wurde.

2.5. ERNTEN DER ZELLEN

Nach Erreichen der gewünschten OD wurden die Zellsuspensionen möglichst rasch abgekühlt und in einer Sorvall Zentrifuge "Superspeed RC 2-B" bei 10000 g abzentrifugiert, mit gekühlter Salzlösung gewaschen und die sedimentierten Zellen bis zur weiteren Verwendung in der Tiefkühltruhe bei -20°C eingefroren.

2.6. AUFBEWAHREN DER STÄMME UND MUTANTEN

Die Kurzzeitaufbewahrung über einige Tage hinweg, z.B. von Verdünnungsausstrichen auf Agarplatten, erfolgte im Kühlschrank bei 4°C, wobei die Plattenstapel in Kunststoffbeuteln verpackt wurden. Für die Aufbewahrung von Zellen über längere Zeiträume hinweg (Monate, Jahre) wurden Kieselgelröhrchen verwendet. 2 ml fassende Glasröhrchen mit Schraubdeckel und Teflondichtung wurden mit 1,5 ml Kieselgel 60, Korngröße 0,063 - 0,2 mm, gefüllt und im Trockenschrank bei 160°C 3 h getrocknet und sterilisiert. In diese Röhrchen wurden Kolonien von einer Agarplatte mit der Impföse eingebracht, mit dem Kieselgel vermischt und anschließend bei -20°C gelagert. Die Reaktivierung der Zellen erfolgte durch Aufstreuen einer Portion Kieselgel auf Festmedium und anschließendem Inkubieren bei den entsprechenden Wachstumstemperaturen.

2.7. ERZEUGUNG UND SELEKTION DER MUTANTEN

2.7.1. Selektionsprinzip

Zur Selektion von ω-cyclohexanfettsäureauxotrophen Mutanten wurde ein Zwischenprodukt der Biosynthese, die Cyclohexancarbonsäure benutzt. Mutanten, die einen Block in einem der Biosyntheseschritte der Cyclohexanfettsäure zwischen Shikimisäure und Cyclohexancarbonsäure haben, dürften nur bei Zufüttern von Cyclohexancarbonsäure die cyclischen Fettsäuren bilden können, und somit wachsen können, vorausgesetzt das Vorhandensein dieser FS ist essentiell für die Organismen. Durch Anwendung der Stempelmethode nach LEDERBERG & LEDERBERG (1952) konnten die auxotrophen Mutanten durch Überstempeln des Koloniemusters von nach der Mutagenese ausgestrichenen Platten mit Cyclohexancarbonsäure auf MM-Platten mit und ohne Vorstufe durch Vergleich des Koloniewachstums identifiziert werden. Um die Ausbeute an Mutanten zu erhöhen, wurde in analoger Weise auch auf shikimisäureauxotrophe Mutanten selektioniert, die neben Auxotrophien im Bereich der aromatischen Aminosäuren ebenfalls cyclohexanfettsäureauxotroph sein müßten.

2.7.2. Mutagenese

Nach verschiedenen Versuchen mit Ethylmethansulfonsäure (EMS), Nitrosoguanidin, citrat- oder phosphathaltigen Inkubationspuffern, Mutantenanreicherung mit Ampicillin, Penicillin, Cycloserin, stellte sich folgendesVorgehen als optimal heraus: Von einer logarithmisch wachsenden Vorkultur (OD=3,0) wurden 1,5 ml entnommen, abzentrifugiert, in 3 ml Minimalmedium ohne Glucose, pH 4,5, aufgenommen und bei 50°C im Wasserbadschüttler nach Hinzufügen von 60 µl EMS 30 min lang inkubiert, was eine mehr als 90%ige Abtötung der Zellen zur Folge hat (KRISCHKE 1982). Anschließend wurden die Zellen einmal mit Minimalmedium ohne Glucose gewaschen und in 14 ml Sporulationsmedium aufgenommen und im Biophotometer inkubiert bei 50°C. Das Sporulationsmedium enthielt zusätzlich 0,2 mM Cyclohexancarbonsäure sowie 200 mg/l Shikimisäure. Die

Zentrifugationsüberstände beim Waschen der Zellen wurden zur Inaktivierung des EMS mit 50 ml 2,5%iger Natriumthiosulfatlösung vermischt.
Die Zellen wurden im Biophotometer bis zu einer OD von 1,2 bis 1,6 inkubiert (10 - 14 Stunden), anschließend eine Verdünnungsreihe angefertigt, geeignete Verdünnungen auf Platten mit Sporulationsmedium und Cyclohexancarbonsäure (0,2 mM) sowie Shikimisäure (200 mg/l) ausgespatelt und die Platten bei 50°C bebrütet. Die Mutantenselektion erfolgte nach 2.7.1.

2.7.3. Selektion von azaleucinresistenten Mutanten

4-Azaleucin ist ein Strukturanaloges von Leucin, mit dessen Hilfe Leucin-Überproduzenten gefunden werden können (WARD & ZAHLER 1973, STIEGLITZ & CALVO 1971). Gewaschene Zellen der cyclohexanfettsäureauxotrophen Mutante wurden unverdünnt, 1:10 und 1:100 verdünnt auf Platten (MM + Chc) mit 600 µg/l und 1000 µg/l Azaleucin ausgespatelt. Nach tagelangem Bebrüten traten einige größere Kolonien auf, die in Flüssigkultur auf Resistenz getestet wurden.

2.8. WACHSTUMSVERSUCHE, TESTVERFAHREN

2.8.1. Biophotometerversuche

Für das Testen der Mutanten, für Wachstumsversuche bei verschiedenen pH- und Temperaturbedingungen in Gegenwart unterschiedlicher Vorstufen und Effektoren, für pH- und Temperaturschockexperimente wurde ein Biophotometer der Firma Toyo Kagaku Sangyo Co., Ltd. "TN-112 M" verwendet. Dieses Gerät bot die Möglichkeit gleichzeitig 12 Inkubationsröhrchen entweder unter konstanten Temperaturen oder einem in gewissen Grenzen wählbaren Temperaturgradienten zu bebrüten, wobei die OD der Kulturen (Rotfilter) sowie die an den einzelnen Röhrchen herrschenden Temperaturen periodisch von Vielkanalschreibern registriert wurden.

Die Röhrchen wurden mit 14 ml Medium gefüllt, autoklaviert und mit ca. 0,2 - 0,5 ml einer gut gewachsenen

Vorkultur beimpft. Nachteilig an diesem Gerät ist, daß zumindest bei hohen Temperaturen aufgrund des Belüftungsprinzips bei gleichzeitiger OD-Messung eine eingeschränkte Sauerstoffversorgung der Kulturen zu erwarten ist.

2.8.2. Shiftexperimente, Schockversuche

Diese Experimente gestatten, die Reaktion von Organismen auf sich mehr oder weniger schnell verändernde Umweltbedingungen zu untersuchen. Oft werden diese Verfahren zur Auslösung von Lipidadaptationen bei Temperaturänderungen angewandt (MC ELHANEY 1984, RUSSEL 1984). Änderungen der Inkubationstemperatur wurden erreicht durch ändern der Temperatur in den Schüttelmaschinen. Rasche Temperaturwechsel in Sekunden, Minuten können durch Umsetzen der Kulturen in entsprechend temperierte Wasserbadschüttelmaschinen erzielt werden. Bei luftgeheizten Inkubationsgeräten dauert die Temperaturangleichung des Kolbeninhaltes bis zu 30 Minuten! Im Biophotometer werden Temperaturschocks erzielt, indem die Kulturen von Wachstumstemperatur in Eiswasser abgekühlt werden, währenddessen das Gerät auf die neue Temperatur gebracht und die Kulturen anschließend wieder eingesetzt werden.
pH-Veränderungen wurden durch Einpipettieren von 0,1 - 1 N H_2SO_4 in die Kulturen erreicht. Entweder wurde die entsprechende Säuremenge auf einmal zugegeben oder bei langsameren Änderungen in kleineren Dosen mehrfach hintereinander. Die benötigte Säuremenge wurde vor dem Versuch an einer entsprechenden Kultur ermittelt, bzw. während des Versuchs Proben zur pH-Messung entnommen.

2.8.3. Fütterung von Vorstufen und potentiellen Hemmstoffen

Die verschiedenen FS-Vorstufen wurden in geeigneten Lösungsmitteln (vorzugsweise Wasser oder Ethanol) aufgenommen und in unterschiedlichen Konzentrationen (nach DE ROSA et al. 1974 oder eigenen Erfahrungen) in steriler Form mit dem entsprechenden pH-Wert dem Nährmedium zugegeben.

Mit dem Ziel, Strukturanaloge von Cyclohexancarbonsäure zu finden und damit eventuell die Biosynthese der cyclischen FS zu hemmen, wurden eine Reihe von Substanzen getestet, die eine strukturelle Ähnlichkeit mit Cyclohexancarbonsäure haben. Diese Substanzen wurden in gelöster Form (wasser- oder ethanolgelöst) in verschiedenen Konzentrationen den Kulturen von Wildtyp und Mutante im Biophotometer zugegeben.
Beim Wildtyp wurde untersucht, ob die Substanzen das Wachstum hemmen, ob sich die Hemmung durch Zugabe von Cyclohexancarbonsäure wieder aufheben läßt; außerdem wurde bei einer oder mehreren Konzentrationen der zugegebenen Substanzen die Kulturen geerntet und gaschromatographisch das FS-Muster bestimmt, um festzustellen, ob die Substanzen auch ohne Wachstumshemmung einen Einfluß auf die FS-Zusammensetzung der Membran ausüben.
Bei den cyclohexanfettsäureauxotrophen Mutanten wurde auf diese Weise getestet, ob die potentiellen Strukturanalogen das Wachstum fördern, also von der Zelle in FS umgewandelt werden.
Eine weitere Möglichkeit, Substanzen auf ihre physiologische Wirkung zu testen, bot sich im Plattendiffusionstest an. Hierzu wurde der Wildtyp oder die Mutante entweder in die oberste Agarschicht eingegossen oder 0,2 ml Flüssigkultur auf dem Agar ausgespatelt. Die zu testenden Verbindungen wurden in gelöster Form in verschiedenen Konzentrationen auf Filterrondellen oder -streifen aufgesaugt und nach Verdunsten des Lösungsmittels auf die Plattenoberfläche gelegt. Nach dem Inkubieren können die Durchmesser des Wachstums- oder Hemmhofes gemessen werden.

2.8.4. Kreuzfütterungstest

Mit Kreuzfütterungstests kann die Lage des genetischen Blocks verschiedener Mutanten der gleichen Biosynthesekette genauer charakterisiert werden.
Die am häufigsten verwendete Methode ist das Ausstreichen der Mutanten nebeneinander auf einem Festmedium, auf dem

die Auxotrophen aufgrund ihres Defektes nicht wachsen. Mutanten, die ein Zwischenprodukt, das vor dem Block angehäuft wird, ausscheiden, füttern damit Mutanten, die den blockierten Enzymschritt bereits früher haben, und diese füttern ihrerseits wieder die anderen Mutanten, vorausgesetzt, die Zwischenprodukte diffundieren gut im Agar.
Bei schlechter Diffusion der Zwischenprodukte kann es von Vorteil sein, die Mutanten zu mischen. Dies erfolgt durch Ausstreichen der Zellen über Kreuz; bei gegenseitiger Fütterung tritt Wachstum in der gemeinsamen Ausstrichspur auf.
Eine weitere Möglichkeit, die im vorliegenden Fall erfolgreich angewendet wurde, ist das gleichzeitige Beimpfen einer Flüssigkultur mit zwei Mutanten, die sich unter Umständen gegenseitig füttern können und damit wachsen.

2.9. TROCKENGEWICHTSBESTIMMUNG

Da die geernteten Zellen oft weiterverwendet wurden, wurde das Trockengewicht nicht wie sonst üblich über das Trocknen der Zellpaste im Wärmeschrank bestimmt. Die Zellen wurden nach dem Ernten im Zentrifugenbecher bei -25°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet in einer Lyophilisierungsanlage vom Typ "Leybold Heraeus GT 2". Das gefriergetrocknete Zellmaterial wurde anschließend gewogen.

2.10. PROTEINBESTIMMUNG

Die Proteinbestimmung erfolgte nach einer modifizierten Methode nach LOWRY et al. (1951). Da die Bestimmung an Zellsuspensionen durchgeführt wurde, mußte das Protein zunächst aus den Zellen freigesetzt werden. Hierfür wurde die Methode im alkalischen Milieu (DREWS 1983) der Trichloressigsäurefällung vorgezogen, da bei letzterer Zentrifugationsschritte anfallen, die bei kleineren Probemengen zu Ungenauigkeiten führen können.
Folgende Reagenzien werden benötigt:

Lösung A: 20 g Na_2CO_3 / Liter entionisiertes Wasser
Lösung B: 0,5 g $CuSO_4$ x 5 H_2O/100 ml + 1% Na-K-Tartrat
Lösung C: 50 ml A + 1 ml B (immer frisch angesetzt)
Lösung D: Folin-Ciocalteau-Regens, 1:2 mit Wasser verdünnt.

Für die Proteinbestimmung wurden 0,8 ml Zellsuspension (OD 0,5 - 1,0) in 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 0,5 ml 0,3 N NaOH 90 min bei 60°C erhitzt. Anschließend werden 5 ml Lösung C unter Rühren (Vortex) hinzugefügt und der Ansatz 10 min im Dunkeln stehen gelassen.
Nach Zugabe von 0,5 ml Lösung D (sofort und gut mischen) und 30 min Stehen im Dunkeln wird die optische Dichte bei 578 nm gegen einen Leerwert gemessen. Die Proben für die Eichkurve (0 - 200 µg BSA/0,8 ml) werden in analoger Weise behandelt, also ebenfalls 90 min bei 60°C erhitzt. Vor der Messung werden die Röhrchen mit den Zellsuspensionen 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert, um gröbere Partikel zu sedimentieren.

2.11. ANALYSE DES HEFEEXTRAKTES

2.11.1. Ionenaustauschchromatographie

Verwendet wurde als Kationenaustauscher Lewatit S 1080 Gl 0,1 - 0,2 mm und als Anionenaustauscher Lewatit M 5080 0,1 - 0,25 mm.
Für die Vorbereitung des Austauschers wurden 3 g Harz zunächst in 10 Volumina 1 M NaOH (Kationenaustauscher) bzw. 1 M HCl (Anionenaustauscher) 30 min quellen gelassen, anschließend abgesaugt, mit dest. Wasser gewaschen bis das Filtrat nicht mehr stark basisch bzw. sauer war. Der Vorgang wurde wiederholt, diesmal jedoch mit 1 M NaOH für den Anionenaustauscher und 1 M HCl für den Kationenaustauscher.

Die Harze wurden nun mit 1 M NaOH in die Na-Form bzw. OH-Form gebracht, wiederum bis zur Neutralität gespült und in eine Glassäule gefüllt (Ø 12 mm).
Zum Equilibrieren wurden beide Austauscher mit 0,02 M Na-Phosphatpuffer auf den Start-pH-Wert gebracht (Kationenaustauscher pH 4, Anionenaustauscher pH 7).
Als Probe wurden 100 mg Hefeextrakt in 2 ml H_2O mit dem entsprechenden pH-Wert aufgetragen und das Effluat durch Spülen mit 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer bei gleichbleibendem pH-Wert erhalten.
Eluiert wurde mit je 15 ml 0,1 M Puffer, beim Kationenaustauscher mit jeweils um eine Einheit steigendem, beim Anionenaustauscher mit jeweils um eine Einheit fallendem pH-

Wert. Die Effluate und Eluate wurden sämtlich auf pH 4 eingestellt und in Konzentrationen entsprechend 1 g Hefeextrakt pro Liter im Biophotometer an der Mutante getestet. Phosphathaltiger Puffer wurde deshalb gewählt, weil Phosphat ein Bestandteil des Mediums ist und von den Organismen offenbar in größeren Mengen toleriert wird.

2.11.2. Gelfiltration

Für die Gelfiltration wurde Biogel P 2 (Polyacrylamid) gewählt, das den Trennbereich zwischen MG 100 - 1800 hat. Das Bettvolumen beträgt 3,5 ml/g Trockengel. 30 g Gel wurden in 500 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 5 Stunden quellen gelassen, anschließend in die Säule gefüllt (Volumen 135 ml) und nochmals mit Phosphatpuffer gespült. Das Ausschlußvolumen des Gels (35 ml) wurde mit 1 ml Dextranblue-Lösung (5mg/ml) ermittelt. Es wurde versucht, die Säule mit verschiedenen Farbstoffen im Molekulargewichtsbereich zwischen 200 und 1000 zu eichen, was jedoch zu keinem verwertbaren Ergebnis führte, da die Farbstoffe z.T. sehr stark in Wechselwirkung mit dem Gel treten (Bromphenolblau, Methylenblau) und demzufolge vom Molekulargewicht unabhängige Verweilzeiten auf der Säule haben. Glutathion (MG 307) wurde mit zweifachem Ausschlußvolumen eluiert. 1 g Hefeextrakt wurde in 2 ml Wasser gelöst, auf die Säule aufgetragen und mit 0,01 M Phosphatpuffer pH 7 eluiert. 10 ml Fraktionen wurden aufgefangen und in der entsprechenden Konzentration (pH 4) an der Mutante im Biophotometer getestet.

2.11.3. Dünnschichtchromatographie von Hefeextrakt

Um den Hefeextrakt in kleinere Fraktionen aufzutrennen, wurde ein Laufmittelsystem für die präparative Dünnschichtchromatographie entwickelt.
Ausgehend vom Extraktionsmittel der Lipide ($MeOH/CHCl_3/H_2O$ 20/10/0,8), das die ninhydrinpositiven Inhaltsstoffe des Hefeextraktes im Bereich der Laufmittelfront konzentrierte, wurde ein Laufmittel gefunden ($MeOH/CHCl_3/H_2O$ 20/15/6), das eine gleichmäßige Verteilung der ninhydrinfärbbaren Komponenten über der Laufstrecke ermöglichte. Die weiteren

Versuche wurden jedoch abgebrochen, da die fraglichen Substanzen bereits auf andere Weise gefunden wurden.

2.12. MESSUNG DES SAUERSTOFFVERBRAUCHES

Sauerstoffverbrauchsmessungen erlauben eine rasche, verzögerungsfreie Kontrolle der Stoffwechselaktivität der Organismen.

2.12.1. Aufbau des Gerätes

Das verwendete Gerät von der Firma Bachofer ist eine Sauerstoffelektrode nach dem Clark-Typ mit gasdurchlässiger Membran und basiert auf einem Entwurf von DELIEU & WALKER (1972). Das Ausgangssignal der Meßanordnung ist nur von konstanten Gerätewerten sowie vom Partialdruck des Sauerstoffs abhängig. Es wird durch einen xy-Schreiber in Abhängigkeit der Zeit aufgezeichnet. Nach dem Einschalten einer frisch bespannten Elektrode dauert es etwa 1 - 2 Stunden, bis eine stabile Basislinie erreicht wird.
Als Probevolumen wurden 1,8 ml verwendet.

2.12.2. Eichung der Elektrode

Der Sättigungswert wird erreicht durch Messung einer mit Luft gesättigten Wasserprobe bei Versuchstemperatur. Die Nullinie ergibt sich durch Zugabe von einigen Kristallen Natriumdithionit zu der mit Luft gesättigten Wasserprobe. Die Differenz zwischen den beiden Meßwerten entspricht dem aus Tabellen entnehmbaren temperaturabhängigen Sauerstoffgehalt luftgesättigten Wassers (Tab. 2).

Tab. 2: Sauerstoffgehalt luftgesättigten Wassers (STEPHEN & STEPHEN 1963).

Temp. (°C)	mg/l O_2	Temp. (°C)	mg/l O_2	Temp. (°C)	mg/l O_2
0	14,55	20	9,07	50	5,50
5	12,76	25	8.21	60	4,68
10	11,24	30	7,48	80	2,81
15	10,05	40	6,40	100	--

2.12.3. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von Zellsuspensionen

Die Zellsuspension wird direkt aus dem Anzuchtgefäß in das Inkubationsgefäß der Sauerstoffelektrode pipettiert und letzteres sofort verschlossen. Die OD der Zellsuspension sollte 1,5 nicht übersteigen, da sonst die Meßzeit durch den hohen Sauerstoffverbrauch sehr kurz wird. Durch die Bohrung im Verschlußstopfen können während der Messung Substanzen ohne Störung des Versuchs zugegeben werden.

Die Registrierung des Ausgangsstromes erfolgte durch einen Servogor xy-Schreiber von Metrawatt. X: 20 s/cm; y: 0,5 mV/cm.

2.13. ATP-MESSUNGEN

Hierfür wurde der ATP-Monitoring-Kit von LKB-Wallac verwendet. Die Messung beruht auf dem Luciferin-Luciferase-System aus dem Leuchtorgan des Glühwürmchens (DE LUCA 1976). Bei der durch die Luciferase katalysierten Reak - tion wird Luciferin durch ATP adenyliert und durch Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid in einen oxidierten, angeregten Zustand gebracht. Bei der Rückkehr in den Grundzustand wird Licht emittiert (560-620 nm), das für den quantitativen ATP-Nachweis genutzt werden kann.

Das ATP-Monitoring-Kit besteht aus dem

- -ATP-Reagens: Es enthält Enzym und Substrat in lyophilisierter Form und wird in 10 ml dest. Wasser aufgenommen.
- -ATP-Standard: Er enthält ATP und wird ebenfalls in 10 ml dest. Wasser aufgenommen, was eine 10^{-5}M ATP-Lösung ergibt. Das weitere Verdünnen erfolgt mit EDTA-Puffer.

Beide Reagenzien wurden in 1-ml-Portionen aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

-Tris-EDTA-Puffer-Lösung (0,1 M,pH 7,75)

6,06 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und 0,372 g EDTA werden mit Essigsäure auf pH 7,75 eingestellt und auf 500 ml mit dest. Wasser aufgefüllt. Der Puffer dient zum Verdünnen von Probe und Standard.

Die Messung wurde durchgeführt in einem LKB-Wallac Luminometer und das Ausgangssignal auf einen xy-Schreiber Servogor von Metrawatt übertragen (x: 20 s/cm).

Probenvorbereitung und Messung:
Für die Eichkurve wurden 0,2 ml Monitoring-Reagens und 0,75 ml Tris-EDTA-Puffer in eine Rundküvette aus Polystyrol pipettiert und die Reaktion nach Zugabe von 0,05 ml ATP-Verdünnungslösung (10^{-6} - 10^{-10} M) und kurzem Mischen gestartet. Die Messung des ATP-Gehaltes in der Zellsuspension erfolgte nach dem gleichen Schema, nur daß hier 20 µl Probenvolumen und 780 µl Tris-EDTA-Puffer verwendet wurden. Die Meßtemperatur betrug 25°C, die Proben wurden entsprechend temperiert. Vor der Messung mußte das ATP aus den Zellen freigesetzt werden.
Es wurden verschiedene Extraktionsmethoden ausprobiert, von denen die KOH-Methode die beste Reproduzierbarkeit erbrachte (LUNDIN & THORE 1975). Hierfür wurden 4,5 ml Extraktionsmittel (10 mM Tris, 2 mM EDTA und 20 mM KOH) im Thermoblock auf 100°C erhitzt, 0,5 ml Bakterienkultur schnell mit der Pipette eingespritzt und 90 sec inkubiert. Nach sofortigem Abkühlen in Eiswasser und Neutralisation mit H_2SO_4 konnte die Probe zur Messung verwendet werden. Der Wert des zellfreien Mediums wurde abgezogen. Der mit Hilfe der Eichkurve bestimmte ATP-Gehalt wurde auf das Trockengewicht bezogen, das parallel zur ATP-Messung bestimmt wurde. Es wurden drei gleiche Proben gemessen und der Mittelwert bestimmt.

2.14 TRANSPORTMESSUNGEN

Die Transportmessungen wurden in Anlehnung an die Methodik von KRULWICH et al. (1972) durchgeführt.
Folgende Transportsysteme wurden untersucht:

Glucosetransport mit 2-Desoxy-^{14}C-Glucose MG 166,
Menge: 50 µCi , spez. Aktivität 59 mCi/mmol,
Konzentration 200 µCi/ml.

Glutaminsäuretransport mit ^{14}C-Glutaminsäure MG 147;
Menge: 50 µCi, spez. Aktivität 200 mCi/mmol,
Konzentration 250 µCi/ml.

Lysintransport mit ^{14}C-Lysin MG 182,7, Menge 50 µCi, spez. Aktivität 300 mCi/mmol, Konzentration 250 µCi/ml.

Die radioaktiven Substanzen wurden jeweils mit nicht radioaktiven auf eine spez. Aktivität von 5 µCi/µmol in 500 µl verdünnt. Für die Aufnahme der Sättigungskurve zur Bestimmung der Transportkonstanten k_t wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Substrataufnahme gemessen bei verschiedenen Konzentrationen. Dazu mußte sichergetellt sein, daß die Substrataufnahme im verwendeten Zeitbereich linear ist, was durch entsprechende Versuche nachgewiesen wurde. Hierfür wurden Zellsuspensionen in Gegenwart des radioaktiven Substrates (0,5 µCi/µmol) bei der höchsten, für die Sättigungskurve erforderlichen Konzentration 5 min inkubiert und alle 60 sec eine Probe entnommen. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde eine Inkubationszeit von 1 min für die Aufnahme der Transportkinetiken gewählt.

Versuchsdurchführung:
Für die Transportexperimente wurden von einer gut gewachsenen Übernachtkultur, pH 4,0, Hefeextraktmedium, die sich noch nicht in der stationären Phase befand, 10 ml Zellsuspension entnommen, zweimal in Minimalmedium pH 4,0 gewaschen, und damit ein 500 ml Schikanekolben mit 100 ml Minimalmedium so angeimpft, daß eine OD von etwa 0,1 resultierte. Bei Versuchen mit der Mutante wurden zusätzlich die entsprechenden FS-Vorstufen zugegeben. Die Kulturen wurden inkubiert bis zu einer OD von 0,5 und wurden im Falle des Aminosäuretransportes direkt oder im Falle der Glucoseaufnahme nach zweimaligem Waschen und anschließender 20minütiger Inkubation ohne C-Quelle für den Transportversuch verwendet. Temperatur und pH-Wert wurden im Verlauf des Kulturwachstums auf die erforderlichen Werte eingestellt.
1 ml dieser Zellsuspension wurde jeweils in ein im Wasserbad auf Versuchstemperatur vorgewärmtes 15 ml Zentrifugenglas, das bereits das radioaktive Substrat enthielt, einpipettiert, kurz auf dem Vortex gemischt und inkubiert. Nach 60 sec wurden 0,8 ml entnommen und in einem Filtrier-

gerät mit 6 Filterhaltern der Firma H. Hölzel über Sartorius Membranfilter Typ, "100 N 11306", 0,45 µm, abfiltriert und sofort mit kaltem Minimalmedium, 10 mM nichtradioaktives Substrat enthaltend, gespült. Dieser Vorgang wurde bei verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt, teilweise Doppelwerte bestimmt. Die Filter wurden in 20 ml Szintillationsröhrchen mit 8 ml Szintillationsflüssigkeit für wässerige Proben Typ "Quickszint 402" der Firma Zinsser aufgelöst und in einem Szintillationszähler Typ "Kontron MR 300" jeweils 5 min gezählt.
Zur vollständigen Auflösung der Filter erwies es sich als günstig, die Proben möglichst über Nacht stehen zu lassen und einige Male zu schütteln.
Die gemessenen Aufnahmewerte wurden in einem Diagramm in Abhängigkeit der Substratkonzentration dargestellt. Aus der daraus ableitbaren doppelt reziproken Lineweaver-Burk-Darstellung konnten die Transportkonstante K_t und der V_{max}-Wert bestimmt werden.
Bei den Aminosäuretransportversuchen wurde den Kulturen 15 min vor der Messung 50 µg/ml Chloramphenicol zugegeben, um die Proteinsynthese zu verhindern.
Beim Einsatz der Hemmstoffe CCCP und DCCD wurden die Zellen 30 sec mit dem Hemmstoff vorinkubiert und dann erst in die Röhrchen mit dem radioaktiven Substrat einpipettiert. CCCP wurde in Ethanol gelöst, DCCD in Ethanol/Wasser 1:1.

2.15. LIPIDEXTRAKTION

Die Extraktion der Gesamtlipide erfolgte nach der Methode von BLIGH & DYER (1959), modifiziert nach KATES (1972). Nasse Zellen (40-50 mg Trockengewicht entsprechend; nasse Zellen haben etwa das 7fache Trockengewicht in zentrifugiertem Zustand) werden in 1 ml dest. Wasser suspendiert und mit 3,75 ml einer Methanol-Chloroform-Mischung (2/1) versetzt. Nach zweistündigem Rühren wird abzentrifugiert (5000 U/min, 10 min), der Überstand in einen Scheidetrichter dekantiert, das Pellet in 4,75 ml Methanol/Chloroform/Wasser (2/1/0,8) resuspendiert und abermals zwei Stunden extrahiert. Nach Abzentrifugieren wird der vorhergehende Schritt nochmals wiederholt.

Die gesammelten Überstände werden in je 2,5 ml entionisiertem Wasser und Chloroform ausgeschüttelt. Die Phasentrennung erfolgt über Nacht, die Chloroformphase wird eingeengt, die wässerige verworfen. Falls die Interphase nach der Phasentrennung immer noch sehr groß ist, wird sie zentrifugiert und die Unterphase dem Zentrifugenglas entnommen. Nichtlipidanteile werden an einer Sephadex-G-25-Säule nach dem Verfahren von WELLS & DITTMER (1963) entfernt.

2.16. LIPIDANALYTIK

2.16.1. Extraktion der Fettsäuren

Die Fettsäureextraktion erfolgte nach KANEDA (1966). 5 mg Lipide (50 mg trockene Zellen) wurden 4 - 5 Stunden bzw. über Nacht in 3 ml 50% Methanol und 1 ml 10% KOH in 50% Methanol in einem 10 ml Hydrolyseröhrchen mit Teflondichtung bei 100°C hydrolysiert. Die neutralen Lipide werden durch dreimaliges Extrahieren mit jeweils 10 ml n-Hexan bzw. Petrolether entfernt. Nach dem Ansäuern mit 1 ml 6 N H_2SO_4 werden die freien FS dreimal mit je 10 ml n-Hexan oder Petrolether extrahiert und im Rotationsverdampfer die vereinigten Extrakte eingeengt.

2.16.2. Veresterung der Fettsäuren

Die eingeengten FS werden durch Hinzufügen von frisch hergestellter Diazomethanlösung methyliert. Es muß solange Diazomethan zugegeben werden, bis die gelbgrüne Färbung der Lösung bestehen bleibt. Nach der Veresterung werden die FS wiederum eingeengt und können in dieser Form in der Tiefkühltruhe lange Zeit aufbewahrt werden.

2.16.3. Hydrierung von Fettsäuremethylestern

Die Methode wird zum Nachweis von Doppelbindungen in FS verwendet. Die FS-Methylester werden in 0,5 ml Methanol aufgenommen und eine Spatelspitze Platinoxid zugefügt. Anschließend läßt man 5 min Wasserstoff durchperlen. Dann wird die Probe zentrifugiert, die Flüssigkeit vorsichtig ohne Platinoxid entnommen, am Rotationsverdampfer eingeengt

und in der für die Gaschromatographie erforderlichen Menge Hexan aufgenommen.

2.16.4. Gaschromatographie der Fettsäuren (KATES 1972)

Die gaschromatographische Trennung der FS-Methylester erfolgte auf einem Gaschromatographen "Aerograph 1440" der Firma Varian. Die Aufarbeitung der vom Detektor gelieferten Signale übernahm ein Integrator "SP 4100" der Firma Spectra Physics. Der Integrator war auf die Ausgabe von Retentionszeiten, Flächenwerten und Prozentanteilen der einzelnen Peakflächen programmiert.

Verwendete Säule: EGSS-X, 3% auf Gas-Chrom Q, 100-120 mesh, Säulenlänge 2 m, Innendurchmesser 1,5 mm gepackte Säule.

Injektor: Temperatur 40°C über der höchsten Säulentemperatur.

Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 40°C über der höchsten Säulentemperatur.

Strömungsgeschwindigkeit der Gase:

Trägergas Stickstoff	25 ml/min
Wasserstoff	25 ml/min
Luft	300 ml/min.

Trägergasdruck am Injektor: ca. 1,6 bar.

Säulentemperatur: Die Auftrennung der FS erfolgte entweder bei konstanter Säulentemperatur von 170°C oder mit einem Temperaturprogramm von 150 bis 180°C bei einer Zunahme von 2°C/min.

Die Proben wurden in n-Hexan aufgenommen und 1 µl mit einer 10-µl-Hamilton-Spritze in den Injektor injiziert.
Die Identifizierung der FS in den Proben erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen von FS aus geeigneten Vergleichssubstanzgemischen.

2.16.5. Quantitative Bestimmung der Fettsäuren

30 mg gefriergetrocknete Zellen oder 5 mg Lipide wurden nach 2.16.1. extrahiert. Vor der Extraktion wurden 0,2 mg Margarinesäure (n-C 17) (2 mg/ml Methanol) als interner Standard dem Ansatz im Hydrolyseröhrchen zugegeben. Margarinesäure ist eine in den Proben nicht vorkommende FS und ergibt aus Homologiegründen das gleiche Detektorsignal wie die

entsprechenden Mengen der physiologischen FS. Die Peakflächen der einzelnen Komponenten im Chromatogramm können mit Hilfe des internen Standards auf das Trockengewicht der eingesetzten Zellen bzw. Lipide bezogen werden.
Die Methode erwies sich als recht gut reproduzierbar, besonders dann, wenn die gleichen Mengen Zellmaterial eingesetzt wurden, und damit die Extraktionsverluste gleich waren.

2.16.6. Hopanextraktion und Derivatisierung

Um die Hopane aus B. acidocaldarius mit langen Seitenketten und Substituenten gaschromatographisch erfassen zu können, müssen sie in eine leichter flüchtige Form überführt werden. Hierfür wird zwischen den vicinalen OH-Gruppen der Seitenkette oxidativ gespalten und nach Reduktion acetyliert (ROHMER & OURISSON 1976). Es entsteht 1-Hydroxyethan-29-hopanacetat.
25 mg Lipide, die zuvor am Vakuum getrocknet wurden, werden in 300 mg Natriummetaperjodat und 3 ml Tetrahydrofuran/Wasser (12/7) eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Überschüssiges Perjodat wird mit einigen Tropfen Glycerin inaktiviert. Nach Hinzufügen von 10 ml Wasser wird dreimal mit 10 ml Petrolether extrahiert, die vereinigten Extrakte am Rotationsverdampfer eingeengt. Anschließend werden die Lipide in 0,2 ml Chloroform gelöst und in 100 mg Natriumborhydrid und 3 ml Ethanol 1 h lang bei Raumtemperatur reduziert. Nach Zusatz von 10 ml Wasser und einigen Kristallen KH_2PO_4 werden die Lipide dreimal mit 10 ml Petrolether extrahiert, die gesammelten Extrakte eingeengt und über Nacht acetyliert mit Essigsäureanhydrid/Pyridin (1/1) und einigen Kristallen Dimethyl-4-aminopyridin als Katalysator. Nun wird die Flüssigkeit in einem Stickstoffstrom bei 60°C entfernt und der Rückstand in Chloroform/Methanol/Hexan (2/1/0,5) aufgenommen.
Zur quantitativen Erfassung der Hopane wird vor der Derivatisierung 1 mg 1-Octadecanyl-glycerol, gelöst in 0,2 ml Tetrahydrofuran/Wasser (12/7), zugegeben. Die Substanz dient als interner Standard und wird ebenfalls derivatisiert.
Mit dem internen Standard wurde vor den quantitativen Mes-

sungen eine Eichung bezüglich des Detektorsignals von Standard und Hopanacetat durchgeführt.

2.16.7. Gaschromatographie der Hopane

Die Gaschromatographie der Hopane wurde auf einem Kapillar-Gaschromatographen der Firma Shimadzu Typ "GC-9 A" mit Slit-Splitless-Injektor und Flammenionisationsdetektor durchgeführt. Die Detektorsignale wurden von einem programmierbaren Integrator Shimadzu "C-R3 A" aufbereitet und die Chromatogramme mit Retentionszeiten, Flächenwerten und Prozentverhältnis der einzelnen Peakflächen zueinander ausgedruckt.

Säule: OV 1701, Länge 30 m, Innendurchmesser 0,32 mm, 0,25 µm Filmdicke; die stationäre Phase ist an die Glaskapillare kovalent gebunden.
Trägergas: Stickstoff 4,5 bar, am Injektor 1 bar.
Brenngas: Luft 0,3 bar, Wasserstoff 0,6 bar.
Injektor- und Detektortemperatur: 330°C.
Temperaturprogramm: 250 - 320°C, 8°C/min.
Splitverhältnis: 1:10

2.16.8. Dünnschichtchromatographie der Lipide

2.16.8.1. Durchführung

Für die Dünnschichtchromatographie der Lipide wurden Kieselgel-60-Platten der Firma Merck verwendet:
HPTLC-Fertigplatten 10 x 10 cm,
DC-Fertigplatten 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm.

Vor der Verwendung wurden die Platten im Trockenschrank bei 110°C eine Stunde aktiviert. Der Auftrag der Lipide erfolgte mit 5-µl-Eppendorf-Pipetten. Die Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme wurde in der Regel zweidimensional in DESAGA-Glastanks durchgeführt, in denen sich zur besseren Kammersättigung runde Filterpapiere befanden, die unten in das Laufmittel eintauchten. Nach jedem Lauf wurden die Platten bei Raumtemperatur bzw. mit dem Fön getrocknet.

2.16.8.2. Verwendete Laufmittel

1. Dimension: Chloroform/Methanol/Wasser (65/25/4) (MINNIKIN et al. 1974)
2. Dimension: Chloroform/Methanol/Wasser/Essigsäure (80/13/0,3/8) (RÖLL 1981).

2.16.8.3. Nachweis der Lipidkomponenten

-Verdünnte Schwefelsäure (KATES 1972). Das getrocknete Chromatogramm wird leicht mit etwa 50% Schwefelsäure eingesprüht, anschließend 30 - 60 min auf 180°C erhitzt (DESAGA-Heizplatte). Unspezifischer Lipidnachweis.
-Phospholipidnachweis (SKIPSKY & BARCLAY 1969). Das schwefelsäure- und molybdänhaltige Reagens wird aufgesprüht; Phospholipide färben sich selektiv blau; anschließend kann erhitzt werden, und alle anderen Substanzen werden sichtbar durch die Wirkung der Schwefelsäure.
-Vergleichsubstanzen wurden entweder am Rand der DC-Platte aufgetragen und nur eindimensional entwickelt oder im Startpunkt mit den Lipiden aufgetragen und cochromatographiert.

2.16.8.4. Halbquantitative Bestimmung der Lipidzusammensetzung

Gleiche Mengen Lipid wurden auf DC-Platten aufgetragen und unter exakt den gleichen Bedingungen (in der selben Kammer) entwickelt. Nach Sichtbarmachen der Substanz gibt die Flekkengröße einen ungefähren Eindruck von den Mengenverhältnissen der Lipide in den einzelnen Proben. Die extrahierten Lipide wurden in Chloroform/Methanol (2/1) mit 10 mg/ml aufgenommen und 60 µl dieser Lösung auf eine 20 x 20 cm DC-Platte aufgetragen und zweidimensional entwickelt.

2.17. DICHTEMESSUNGEN AN LIPIDEN

2.17.1. Meßprinzip

Die Hauptkomponenten des Versuchsaufbaus sind zwei Meßzellen (DMA 602 H, Firma A. Paar), die von dem Densimeter DMA 60 gesteuert werden. Die Meßzellen werden durch ein thermostatgeregeltes Wasserbad "HAAKE F 3 digital" temperaturstabilisiert. Eine Regelvorrichtung ermöglichte ein Temperaturpro-

gramm mit einstellbaren Gradienten. Das Funktionsprinzip beruht auf der Arbeit von KRATKY et al. (1973). Es wird die Eigenfrequenz eines elektronisch zu Schwingungen angeregten mechanischen Oszillators gemessen. In der Praxis wird ein U-förmiges, hohles Rohr verwendet, dessen Geometrie definierte Auslenkungen erlaubt. Die Schenkel des Rohres sind fixiert, am Bogen ist ein Magnet befestigt. Mit dessen Hilfe wird über Spulen das Rohr zu ungedämpften Schwingungen angeregt, gleichzeitig deren Schwingungsdauer mit einer Empfängerspule gemessen. Die Schwingungsdauer ist abhängig von der Masse des Rohres und damit auch von der Dichte der eingefüllten Probenflüssigkeit.

$m = M_o + V$, M_o Vibratormasse, V Probenmasse

Resonanzfrequenz des Systems: $2\pi f = \sqrt{\frac{c}{m}} = \sqrt{\frac{c}{M_o + \varrho V}}$

daraus folgt für die Dichte: $\varrho = A(T^2-B)$ bzw. $\varrho_1 - \varrho_2 = A\Delta(T^2)$

Gemessen wird die Dichtedifferenz gegen Wasser.
A und B sind Konstanten die c, M_o und V enthalten.

A und B sind Apparatekonstanten, die von Zeit zu Zeit wegen der Alterung des Systems mit reinem Wasser und Luft ermittelt werden müssen. Durch Messung der Schwingungsdauer des Systems kann die Probendichte mit hoher Genauigkeit ermittelt werden.

Das Ausgangssignal des Densimeters wurde auf einem geeichten xy-Schreiber in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet.

Diese Messkurve wurde mit Hilfe eines Hewlett-Packard-Plotters (Modell 9872 A), der mit einem Hewlett-Packard-Rechner (Modell 9845 A) verbunden war, digitalisiert, in eine spezifische Volumen-Temperatur-Kurve umgeformt und auf Disketten abgespeichert. Mit dem Rechner konnten auch die verschiedenen aufgenommenen Kurven zum besseren Vergleich in ein Diagramm projiziert und ausgedruckt werden. Da es sich bei den untersuchten Lipiden um die Gesamtlipidfraktion handelt, konnte kein Molekulargewicht angegeben werden und die Kurven nicht in der sonst üblichen Form Molekülvolumen/Temperatur dargestellt werden.

Die Daten zur Berechnung der thermischen Volumenausdehnungskoeffizienten wurden auf graphischem Wege aus den Kurven er-

mittelt und nach folgender Gleichung im Temperaturintervall T_1=50°C und T_2=60°C berechnet.

$$\alpha = \frac{1}{V}\left[\frac{\delta V}{\delta T}\right]_p \quad [1/°C]$$

α: Volumenausdehnungskoeffizient
δV: Differenz der spez. Volumina bei T_1 und T_2.

2.17.2. Probenvorbereitung

Die Lipide wurden vor der Verwendung nochmals bei erhöhten Temperaturen im Vakuum gut getrocknet und gewogen. Anschließend wurden durch Zugabe von dest. Wasser Suspensionen hergestellt mit Konzentrationen von 10 mg/ml. Die Proben wurden bei ca. 50°C geschüttelt bzw. in einem Ultraschallwasserbad beschallt, um homogene Dispersionen zu erhalten. Dann wurden die Proben entgast und etwa 1,2 ml in die vorher gut gespülte und getrocknete Meßzelle eingefüllt. Nachdem der Temperaturausgleich erfolgt war, wurde die Messung gestartet. In der Regel wurden zwei Heiz- und Abkühlzyklen von jedem Lipid aufgenommen. Der Temperaturbereich lag zwischen 5 und 60°C, der Gradient betrug 20°C/h.

2.18. DIFFERENTIALKALORIMETRIE

2.18.1. Meßprinzip

Die Phasenumwandlung der Lipidgemische wurde mit dem Privalov-Kalorimeter gemessen (PRIVALOV et al. 1975). Bei der Phasenumwandlung eines Lipids, die einem Schmelzvorgang vergleichbar ist, ändert sich die Wärmekapazität des Systems und damit auch der Bedarf an Heizenergie, der zugeführt werden muß, um die Temperatur gleichmäßig zu erhöhen. Bei einem Differentialkalorimeter wird die Differenz der Wärmemengen gemessen (in Form von elektrischer Energie), die nötig ist, um das Probensystem und ein Referenzsystem jeweils gleichmäßig schnell aufzuheizen. Ist die Wärmekapazität von Probe und Referenz gleich, ist die Differenz Null. Unterscheidet sich die Wärmekapazität der Probe von der der Referenz, wie es etwa bei energieabhängigen Prozessen wie der Phasenumwandlung der Fall ist, so nimmt die Differenz einen bestimmten Wert an, der als Zusatzheizleistung in Abhängig-

keit von der Temperatur oder Zeit registriert wird und als Umwandlungsenthalpie in einem Zeit- oder Temperaturintervall integriert wird.

2.18.2. Aufbau des Gerätes

Die beiden scheibenförmigen Probengefäße bestehen aus Gold, fassen 1 ml und werden über ein Platinröhrchen gefüllt. Eine Thermosäule, die mit beiden Gefäßen mehrfach verbunden ist, steuert einerseits die Gefäßheizung, so daß sich beide Probengefäße auf gleicher Temperatur befinden, andererseits die Zusatzheizung, die Unterschiede in der Wärmekapazität durch Strukturumwandlungen ausgleicht. Die Heizleisung der Zusatzheizung wird registriert und als Kalorigramm aufgezeichnet. Die Probengefäße sind von zwei adiabatischen Mänteln aus Silber umgeben, die ebenfalls temperaturgeregelt sind.

2.18.3. Probenvorbereitung und Messung

Die Lipidproben wurden im Vakuum mehrere Stunden getrocknet, gewogen und zu einer Konzentration von 3,3 mg/ml in bidest. Wasser aufgenommen. Durch Erwärmen auf ca. 50°C, Schütteln auf dem Vortexmischer und 2 min Beschallen im Ultraschallwasserbad wurden homogene Lipiddispersionen hergestellt. Diese wurden vor der Messung ca. 30 - 60 min bei 5°C temperiert und mit einer Glasspritze mit langer Kanüle ohne Luftblasen in das saubere Probengefäß des Kalorimeters eingefüllt. Die Referenzzelle enthielt bidest. Wasser. Die Meßzellen wurden auf ca. 0,5°C abgekühlt und die Messung gestartet mit einem Temperaturanstieg von 1°C/min. Jedes Lipid wurde zweimal gemessen.

3. ERGEBNISSE

3.1. TEMPERATUR- UND PH-EINFLUSS AUF DAS FETTSÄUREMUSTER BEI BACILLUS ACIDOCALDARIUS

Die in der Literatur vorgefundenen Werte über die Abhängigkeit des Gehaltes cyclischer FS von Temperatur und pH-Wert lassen nur schlecht Tendenzen oder Übereinstimmungen erkennen.

- OSHIMA & ARIGA (1975) konnten keinen deutlichen Effekt der Umweltbedingungen auf die Mengenverhältnisse der Cyclohexanfettsäuren finden. Bei Maximalwerten von pH und Temperatur im untersuchten Bereich (<55°C, >60°C, pH 2,5, pH 5) ist ein niedriger Gehalt dieser FS zu beobachten, d.h. weniger als 55%.
- DE ROSA et al. (1974) stellten bei ihren Experimenten fest, daß bei niedrigen pH-Werten (pH 2 - 3) der Prozentsatz cyclischer FS mit der Temperatur abnimmt, bei hohen pH-Werten (pH 4 - 5) diese FS mit der Temperatur zunehmen. Begründet wird dies mit dem hohen Energiebedarf der Zellen bei niederen pH-Werten durch Ionenpumpen, der den bei hohen pH-Werten vorhandenen Temperatureffekt überkompensiert. Die vermehrte Bildung cyclischer FS bei hohem pH-Wert und hohen Temperaturen wird als metabolischer Effekt auf der Basis der geringen Sauerstoffverfügbarkeit verstanden. Eine Abhängigkeit des FS-Musters von verschiedenen Belüftungsraten bei unterschiedlichen Umweltbedingungen wurde allerdings nicht durchgeführt. Insgesamt zeigt sich jedoch eine mit der Protonenkonzentration ansteigende Menge cyclischer FS (Abb. 2).

Von PORALLA (pers. Mitteilung) durchgeführte Versuche ergaben etwas eindeutigere Tendenzen.

- Bei pH 5 ergab sich die bereits von DE ROSA et al. (1974) festgestellte Zunahme der Cyclohexanfettsäuren mit der Temperatur: bei 50°C 55%, bei 60°C 82% cyclische FS.
- Bei pH 2,5 zeigte sich gleichfalls eine Zunahme der Cyclohexanfettsäuren mit der Temperatur: bei 50°C 75%, bei 60°C 87% cyclische FS, insgesamt ein höherer Anteil dieser FS

sowie eine starke Zunahme der Cyclohexanfettsäure C 19 bei gleichzeitig geringer Abnahme der C 17. Die Versuche wurden unter gleichen Kulturbedingungen durchgeführt in Sporulationsmedium.
Insgesamt gesehen wird die Bildung cyclischer FS bei B. acidocaldarius durch niedrigen pH-Wert und hohe Temperaturen gefördert. Ferner konnte eine Abhängigkeit der Menge cyclischer FS von der Wachstumsphase beobachtet werden: Ältere stationäre Kulturen wiesen einen höheren Prozentsatz dieser FS auf als logarithmisch wachsende, was bei der Konzeption von Versuchen zu beachten ist.

Eigene Experimente zu diesem Problem wurden in Form von Temperaturshiftversuchen bei pH 3,5 und Sporulationsmedium durchgeführt. Die Kolben wurden bei der Anfangstemperatur inkubiert bis zu einer OD von 2,0 und dann innerhalb von 5-10 min auf die neue Temperatur umgestellt. Die Zellen wurden 30 - 60 min nach dem Shift geerntet und analysiert.
Die FS-Analysen zeigen, daß die rasche Temperaturanpassung des FS-Musters bei einem gegebenen pH-Wert im wesentlichen über die Kettenlänge der cyclischen FS geregelt wird, wobei sich der Gesamtgehalt nur wenig ändert (Abb. 3).

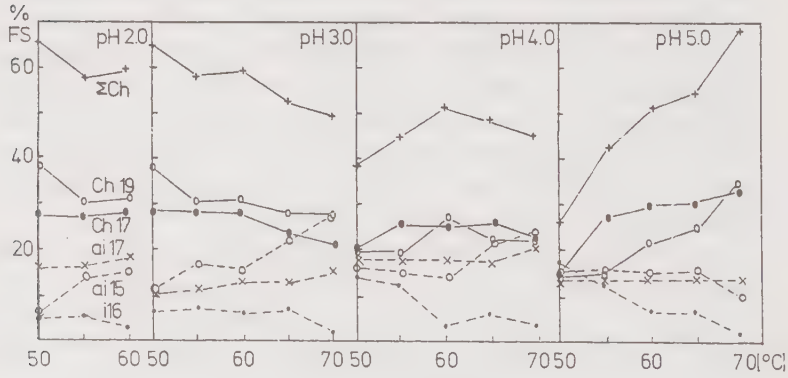


Abb. 2: Fettsäuremuster von B.acidocaldarius bei unterschiedlichen Temperaturen und pH-Werten. Nach DE ROSA et al. (1974).

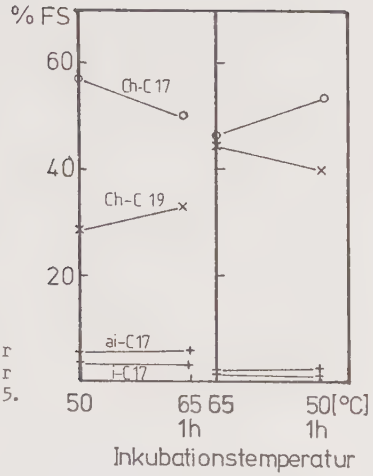


Abb. 3: Änderungen im FS-Muster bei B. acidocaldarius nach rascher Erhöhung bzw. Erniedrigung der Wachstumstemperatur bei pH 3,5.

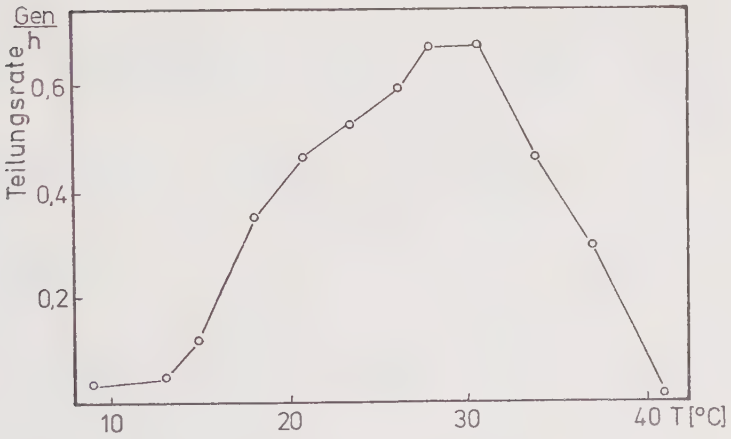


Abb. 4: Teilungsrate von Brevibacterium pusillum bei unterschiedlichen Temperaturen und pH 7,3.

Bei den beschriebenen Versuchen konnten keine ausgeprägten Einflüsse der Umweltbedingungen auf die Mengenverhältnisse der zu geringeren Anteilen vorhandenen verzweigten und geradkettigen FS festgestellt werden.

3.2. TEMPERATUR - UND PH-ABHÄNGIGKEIT DES FS-MUSTERS BEI BREVIBACTERIUM PUSILLUM

Nach der Publikation von SUZUKI et al. (1981) zeigt Br. pusillum ausgeprägte Temperaturadaptationen im FS-Muster. Dieses Bakterium enthält als bisher einziger mesophiler Organismus ω-Cyclohexanfettsäuren neben meist geringeren Mengen iso-, anteiso-C-15, iso-, n-C-16, iso-, anteiso-C-17. Der Organismus wurde 1965 aus Ölschlämmen isoliert und wächst nach eigenen Messungen zwischen 10 und 37°C.
Das FS-Muster wurde ermittelt von Kolbenkulturen nach 15 h Inkubation

- bei pH 7,2 und verschiedenen Temperaturen (Abb. 5),
- bei 21, 30 und 36°C und pH-Werten von 5,6,7,8,9 (Abb. 6).

Die Analysenergebnisse zeigen eine interessante Variante der Temperaturadaptation. Viel ausgeprägter als bei B. acidocaldarius werden bei diesem Organismus bei höheren Temperaturen vermehrt cyclische FS gebildet (Abb. 5) auf Kosten der verzweigten. Bei 16°C sind 15%, bei 38°C 76% Cyclohexanfettsäuren vorhanden. Die verzweigten FS nehmen entsprechend ab, vor allem die kurzkettigen anteiso-C-15.
Der pH-Effekt ist gleichfalls sehr deutlich ausgeprägt. Bei 30 und 36°C ist eine Zunahme der cyclischen FS von 55% bei pH 9 auf 80% bei pH 5 zu registrieren. Besonders auffällig ist die Änderung bei 21°C: Hier verändert sich der Gehalt dieser FS von 17% (pH 8) auf 70% (pH 5). Für die Auswertung wurden nur die Hauptkomponenten mit mehr als 4% verwendet, die restlichen FS kommen nur in sehr geringen Mengen vor, so daß deren Erfassung mit größeren Fehlern behaftet ist.

Die Abhängigkeit des Gehaltes der Cyclohexanfettsäuren von der Glucosekonzentration wurde bei versuchsweise hohen Konzentrationen beobachtet, dürfte jedoch bei den durchgeführten Experimenten keine Rolle spielen, da die in den Medien vorhandenen Mengen unter 0,5% lagen, und erst Konzentrationen von über 4% zu einem vergleichsweise höheren Gehalt cyclischer FS führten. Dies ergibt sich auch aus Abb. 3 in SUZUKI et al. (1981). Der Prozentsatz cyclischer FS schwankt kaum in Abhängigkeit des Kulturalters.

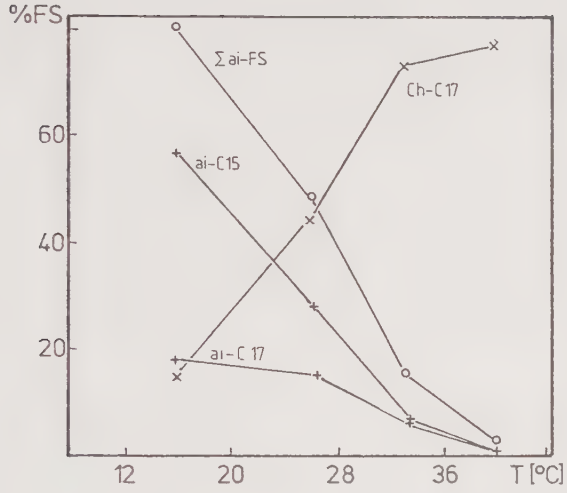


Abb. 5: FS-Muster von Br. pusillum in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur bei pH 7,2. Dargestellt sind die Hauptkomponenten mit mehr als 4%-Anteil.

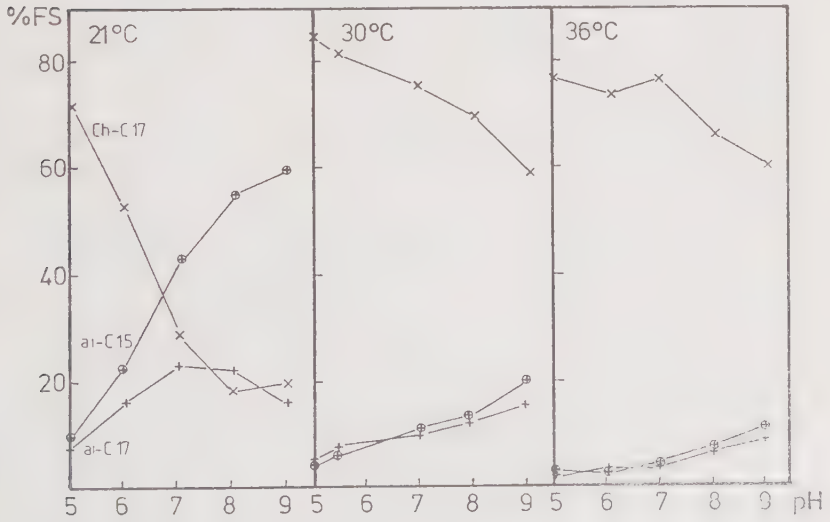


Abb. 6: FS-Muster von Br. pusillum in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur bei unterschiedlichen pH-Werten. Dargestellt sind die Hauptkomponenten mit mehr als 4%-Anteil.

Obwohl B. acidocaldarius und Brevibacterium pusillum nahezu das gleiche FS-Muster aufweisen, bei gewissen Umweltbedingungen sogar ähnliche Konzentrationen der einzelnen Komponenten erreichen, liegen hier offenbar verschiedene Mechanismen vor für die Adaptation an unterschiedliche pH- und Temperaturbedingungen. B. acidocaldarius enthält nahezu bei allen Bedingungen einen Anteil cyclischer FS von über 50% und reguliert innerhalb dieser FS mit der Kettenlänge, was beides bei Brevibacterium pusillum nicht der Fall ist. Es ist jedoch klar zu erkennen, daß in beiden Fällen die cyclischen FS die wesentliche Rolle spielen, wenn Temperatur und Protonenkonzentration die obere Grenze des Wachstumsbereiches erreichen.

3.3. STRUKTURANALOGE VON CYCLOHEXANCARBONSÄURE

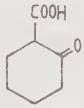
Das Ziel dieser Arbeit, die Funktion cyclischer Fettsäuren durch Unterdrückung ihrer Synthese zu untersuchen, wurde auf zwei Wegen zu erreichen versucht. Die eine Möglichkeit ist das Arbeiten mit entsprechenden Mutanten, die andere die Hemmung der Produktion cyclischer FS durch geeignete Inhibitoren. Die Synthesehemmung durch Inhibitoren erschien deshalb erfolgversprechend, da die Cyclohexanfettsäuren auf einem für FS ungewöhnlichen Weg hergestellt werden. Startermolekül für die FS-Synthese ist sehr wahrscheinlich Cyclohexancarbonsäure, die sich über mehrere Zwischenschritte aus Shikimisäure ableitet (DE ROSA et al. 1972, OSHIMA & ARIGA 1975). Die Autoren zeigten ferner, daß eine ganze Reihe von Vorstufen mit geraden, verzweigten und ringförmigen Resten zu FS verlängert wird, das Schlüsselenzym für diesen Vorgang, die Primer-Transacylase, offenbar nicht sehr spezifisch ist.
Eine selektive Hemmung des Biosyntheseweges für Cyclohexanfettsäuren wäre vorteilhaft, da hiermit zum einen die Synthese der sonst noch vorkommenden verzweigten FS nicht beeinträchtigt wird. Die Organismen wären vermutlich immer noch wachstumsfähig, was z.B. nicht der Fall ist bei FS-Syntheseinhibitoren wie Cerulenin (WILLE et al. 1975), die zudem noch Verschiebungen im Phospholipid-Muster verursachen (MAHAJAN & KHULLER 1984). Andererseits wird dieser Syntheseweg nach der-

Tab. 2: Substanzen, die an eingegossenen Organismen von B. acidocaldarius auf Minimalmedium pH 4, 55°C im Plattendiffusionsverfahren als Strukturanaloge von Cyclohexancarbonsäure getestet wurden. + = Hemmwirkung.

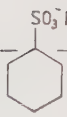
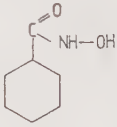
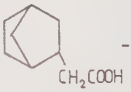
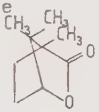
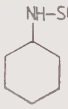
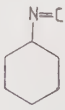
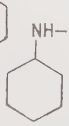
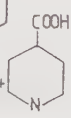
Filterrondellen mit	5 µl	10 µl	50 µl (10mM Lösung)	
Adamantancarbonsäure	-	-	++	
Bromfuran-2-carbonsäure	-	-	-	
p-Brommethylbenzoesäure	-	-	++	
Cyclobutancarbonsäure	-	-	+	
Cyclohexanbuttersäure	-	+	+	Bei vorhandener Hemmwirkung konnte keine Aufhebung durch Cyclohexancarbonsäure erreicht werden.
Cyclohexan-1-4-dicarbonsäure	-	-	-	
Cyclohexansulfonamid	-	-	-	
2-Cyclopentenessigsäure	-	-	+	
4-J-Cyclohexancarbonsäure	-	-	-	
5-Nitrofuran-2-carbonsäure	-	-	+	
Norbonylessigsäure	-	-	-	
Piperidin-2-carbonsäure	-	-	-	

Tab. 3: Strukturanaloge von Cyclohexancarbonsäure, die im Biophotometer am Wildtyp und an den cyclohexanfettsäureauxotrophen Mutanten bei 55°C, pH 4 getestet wurden.

Substanz	Wirkung auf Wildtyp	Wirkung auf Mutante
	+ = Wachstum (bei der Mutante Fettsäuresynthese)	
	- = kein Wachstum	
	# = nicht getestet	
1-Cyclohexencarbonsäure	+	+
2-Cyclohexencarbonsäure	+	+
3-Br-Cyclohexancarbonsre.	+	+
4-J-Cyclohexancarbonsre.	+	+
Cyclopentancarbonsäure	+	+
Cycloheptancarbonsäure	+	+
Cyclobutancarbonsäure	+	-
Cyclooctancarbonsäure	+	-
Benzoesäure	+	-
Cyclohexanon-2-carbonsre.	+	-
Cyclohexanoncarbonsäureethylester	+	-



Tab. 3: (Fortsetzung)

Cyclohexansulfonsäure		+	-
Cyclohexansulfonamid		+	-
Cyclohexancarboxylamid		+	+
Cyclohexanhydroxamsäure		+	+ (normale FS)
Adamantancarbonsäure		-	-
Norbonylessigsäure		-	-
Camphansäure		+	-
Natriumcyclohexansulfamat (Cyclamat)		+	-
Cyclohexancarbonsäure-hydrazid		+	#
Methylcyclohexylketon		+	#
trans-4-Aminomethyl-cyclohexancarbonsre.		+	#
trans-Cyclohexan-1,4-di-carbonsäure		+	#
1-Methyl-cyclohexan-carbonsäure		+	#
Cyclohexanessigsäure		+	+
Cyclohexanpropionsäure		+	+
Cyclohexanbuttersäure		-	+/-
Cyclohexanisocyanat		+	-
Cyclohexanformamid		+	-
Piperidin-4-carbonsäure		+	-
Sulfinsäure		+	#

zeitigem Wissen nicht für andere Produkte des Zellmetabolismus benötigt, also keine Auswirkungen der Inhibitoren auf den sonstigen Zellstoffwechsel zu erwarten sind.
Als potentielle Inhibitoren wurden verschiedene Substanzen getestet, die in irgendeiner Weise strukturanalog zu Cyclohexancarbonsäure sind. Dabei wurden verschiedene Wege eingeschlagen. Veränderungen von Cyclohexancarbonsäure konnten entweder durch verschiedene Substituenten am Ring vorgenommen werden oder durch die Modifizierung der Carboxylgruppe erfolgen. Beispiele für das Design strukturanaloger Substanzen finden sich in GOLOVINSKY (1984). Die Substanzen wurden teilweise von Herrn Dr. Gekeler am Inst. f. Org. Chemie synthetisiert. Der Einsatz der Substanzen setzte voraus, daß sie einigermaßen wasserlöslich waren, um für den Organismus verfügbar zu sein. In Tab. 2 sind die Substanzen aufgelistet, die im Plattendiffusionstest auf Wachstumshemmung sowie deren Aufhebbarkeit durch Cyclohexancarbonsäure überprüft wurden.
In Tab. 3 sind die im Biophotometer getesteten Substanzen aufgeführt.
Es konnte bei keiner der eingesetzten Substanzen eine deutliche Verringerung des Gehaltes an Cyclohexanfettsäuren festgestellt werden. Problematisch war in manchen Fällen, daß besonders bei lipophilen Molekülen eine Wachstumshemmung zu beobachten war, die vermutlich auf eine detergenzienähnliche Wirkung der Substanzen auf die Membranintegrität zurückzuführen ist. Denkbar sind auch inhibitorische Effekte an anderen Stellen im Zellstoffwechsel.
Adamantancarbonsäure wirkte wachstumshemmend auf B. acidocaldarius; bei manchen Versuchen konnte ein leichter Rückgang (ca. 10%) der cyclischen FS festgestellt werden, der sich jedoch nicht reproduzieren ließ.
Eine weitere Substanz wurde aufgrund eines Mißverständnisses in den Test genommen. Es handelt sich um Dioxoheptansäure (DOHA), ein Inhibitor der 5-Aminolävulinsäure-Dehydrase. Besonders bei hohen Temperaturen wird ab 0,2 mM das Wachstum gehemmt, 0,1 mM Konzentrationen senken den Gehalt an cyclischen FS bei 55°C, pH 4 nach 3 Stunden Inkubation von 59% auf 40% ab. Die Wachstumshemmung ließ sich durch Cyclohexancarbonsäure

nicht, durch Shikimisäure zumindest teilweise aufheben. DOHA hat eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit mit 3-Desoxy-D-arabinoheptulosanat, eine Substanz, die am Beginn der Aromatenbiosynthese steht. Möglicherweise hemmt DOHA als Strukturanaloges an dieser Stelle die Aromatenbiosynthese.
Abschließend läßt sich sagen, daß mit der verwendeten Methodik keine spezifisch die Biosynthese der Cyclohexanfettsäuren hemmende Substanz gefunden werden konnte.
Wie die Versuche mit den cyclohexanfettsäureauxotrophen Mutanten ergaben, resultiert die Blockierung der Biosynthese cyclischer FS in einer Wachstumshemmung, da die Organismen nicht genügend andere FS herstellen können. Bei einem weiteren Screening nach Inhibitoren müßten also nur die Fälle genauer untersucht werden, bei denen das Wachstum durch die zugegebenen Substanzen gehemmt wird.

3.4. MUTANTEN AUS DEM ERSTEN SCREENING

3.4.1. Mutantenscreening

Für die Erzeugung der Mutationen wurden die Bedingungen aus Krischke (1982) übernommen.
Da in der vorliegenden Arbeit gezielt nach bestimmten Mutanten gesucht wurde, erwies es sich zunächst als sinnvoll, an die Mutagenese ein Mutantenanreicherungsverfahren anzuschliessen. Bei diesem Anreicherungsverfahren werden Antibiotika benutzt, die auf die Synthese der Zellwand wirken und nur wachsende Zellen abtöten. Die eingesetzten Anitbiotika waren Penicillin G, Ampicillin und Novobiocin.
Penicillin G wurde in Konzentrationen von 0,3 - 1 mg/ml eingesetzt, es mußte in der Regel etwa 14 - 20 Stunden inkubiert werden, in denen die OD nur wenig abnahm, die Lebendzellzahl jedoch etwa um den Faktor 100. Bei höheren Penicillinkonzentrationen trat nach Inkubation bei Wachstumstemperaturen ein intensiver Schwefelwasserstoffgeruch auf. Entweder zersetzte sich das Antibiotikum oder es wurde von den Organismen abgebaut, jedenfalls dürfte der entstehende Schwefelwasserstoff toxisch sein. Nach einer Mitteilung von SONNLEITNER (ETH Zürich), der Medienoptimierung bei B. acidocalda-

rius in kontinuierlichen Kulturen betrieben hat, wirkt auch Cystein über das Entstehen von Schwefelwasserstoff toxisch auf die Kulturen.
Ampicillin wurde in den gleichen Konzentrationen eingesetzt wie Penicillin G, die Inkubationszeiten zur Abtötung der Zellen waren ähnlich lange. Verwendet wurde es wegen seiner besseren Säurestabilität, was für längere Inkubationen bei niederen pH-Werten eine Rolle spielen könnte.
Da bei den Penicillin-Antibiotika, wie oben erwähnt, die Gefahr der Zellschädigung durch Schwefelwasserstoff nicht auszuschließen war, wurde schließlich Novobiocin eingesetzt und zwar in einer Konzentration von 20 µg/ml, Inkubation über Nacht. Interessant war, daß die Novobiocin-Wirkung durch Glutaminsäure antagonisiert wurde.
Die optimale Konzentration der Antibiotika wurde jeweils in Biophotometerversuchen in Minimalmedium 50°C, pH 5 ermittelt. Anhaltspunkte waren der Arbeit von DE ROSA et al. (1971-1973) zu entnehmen. Als problematisch erwies sich das oftmalige Waschen der Zellen nach der Mutagenese, der Wachstumsphase, der Mutantenanreicherung und vor dem Ausplattieren. Dabei wurden die Zellen immer um 20 - 30°C abgekühlt, was zu langen lag-Phasen beim nächsten Versuchsschritt führte. Das Zentrifugieren bei höheren Temperaturen ist vermutlich gleichfalls nachteilig, da die Zellen hierbei unter Sauerstoffmangel geraten. Als Konsequenz wurden praktisch alle Versuchsschritte nach der Mutagenese im Biophotometer durchgeführt, um die lag- und Wachstumsphasen gut verfolgen zu können.
Zur Kontrolle der Mutagenese wurden durch Selektion auf Hefeextrakt-Pepton-Medium und Minimalmedium auxotrophe Mutanten isoliert. Bei diesen Versuchen ergab sich eine Mutantenhäufigkeit von etwa 2% der auf den Platten gewachsenen Kolonien.
Aus dem Selektionsverfahren konnten ca. 200 verdächtige Kolonien, die auf den Platten mit Cyclohexancarbonsäure besser wuchsen, isoliert werden. Nach dem Klonieren wurden sie im Biophotometer auf die Abhängigkeit des Wachstums von Cyclohexancarbonsäure getestet. Durch diesen Test wurde der weitaus größte Teil mit Wildtypeigenschaften ausgeschieden, bei einigen wenigen Fällen wurde noch das FS-Muster von mit und

ohne Cyclohexancarbonsäure gewachsenen Kulturen bestimmt. Als Resultat wurden vier Mutanten gefunden, die ein von der cyclischen Vorstufe abhängiges Wachstum zeigten: M 13, 20, 33, 36.
M 13 wuchs nur in Gegenwart von Cyclohexancarbonsäure, während die anderen drei Mutanten, die zudem aus einem Mutageneseansatz stammten, auch ohne diese Vorstufe langsam wachsen konnten. Das FS-Muster von diesen drei Mutanten wies als Minimum etwa 30% cyclische FS auf.
Da das Testen der Mutanten im Biophotometer eine relativ aufwendige Angelegenheit darstellte, wurde versucht für die bei späteren Versuchen erforderlichen Identitätskontrollen einen Plattentest zu entwickeln. Jedoch zeigte sich, daß die Mutante 13, die im Biophotometer ohne Vorstufe praktisch nicht wachsen konnte, auf Platten mit Minimalmedium sehr langsam zu wachsen vermochte, jedoch mit der Vorstufe im Agar auch nur geringfügig schneller wuchs, so daß die Unterscheidung schwierig war. Die Kontrollen der Versuchskulturen auf Revertanten wurden also weiterhin mit Flüssigkulturen durchgeführt, wobei die Analyse des FS-Musters nach den Versuchen mit der Mutante die sicherste Kontrolle darstellte.
Das schlechte Wachstum der Mutanten auf den Platten mit Minimalmedium ließ Rückschlüsse auf die schlechte Mutantenausbeute beim Screening zu. Weitere Probleme bei Plattenversuchen ergaben sich durch das Alter der Platten. Auf Platten, die älter als eine Woche waren, wuchsen die Zellen nicht mehr reproduzierbar an, so daß laufend frische Platten hergestellt werden mußten, und damit der Plattentest vom Aufwand her gegenüber dem Biophotometer an Boden verlor.

3.4.2. Charakterisierung der Mutante 13

3.4.2.1. Wachstum mit Cyclohexancarbonsäure

Da nur die Mutante 13 strikt auf Cyclohexancarbonsäure angewiesen war, wurde mit dieser weitergearbeitet.
Abb. 7 zeigt das Wachstum bei verschiedenen Konzentrationen der Vorstufe bei 60°C, pH 4,2.
Die Kontrolle ohne Vorstufe wächst nicht, die Zellen enthalten 43% cyclische FS, die aus der Vorkultur stammen. Shikimisäure

(100 mg/l) fördert das Wachstum nicht. Die Kultur mit 1 mg/l (8 µM) enthält 71%, die Kulturen ab 2 mg/l etwa 80% Cyclohexanfettsäuren.
Bei pH 4,2 und 50°C sind zwischen 1 und 40 mg/l Vorstufe ca. 46% cyclische FS vorhanden, die bei höherer Temperatur gewachsenen Zellen enthalten also mehr cyclische FS, bzw. benötigen eine größere Menge dieser FS zum Wachsen.

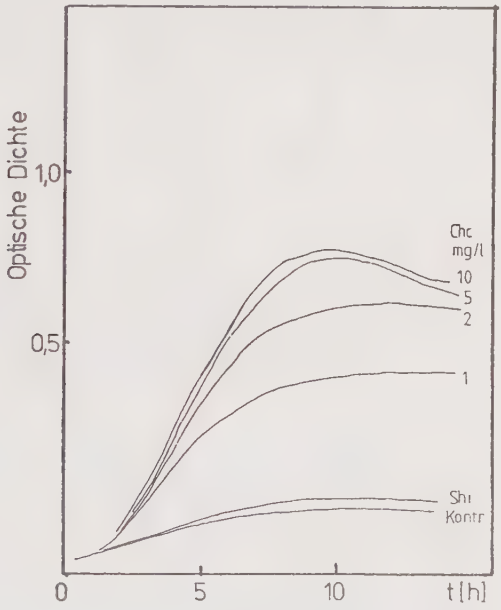


Abb. 7: Wachstum von M 13 bei unterschiedlichen Konzentrationen von Cyclohexancarbonsäure, MM, 60°C, pH 4,2.

3.4.2.2. Wachstum der Mutante auf Hefeextrakt

Bei manchen Versuchen wurde festgestellt, daß Hefeextrakt das Wachstum der Mutante stark fördert. Bei einem Kontrollversuch ohne cyclische Vorstufe wuchsen die Zellen ebenfalls, und zwar schneller als mit der Vorstufe allein. Die Kulturen mit Hefeextrakt wiesen nach dem Animpfen eine etwas längere lag-Phase auf als die Kulturen, denen zusätzlich noch Cyclohexancarbonsäure zur Verfügung stand. Das Wachstum auf Hefeextrakt war konzentrationsabhängig (Abb. 8).

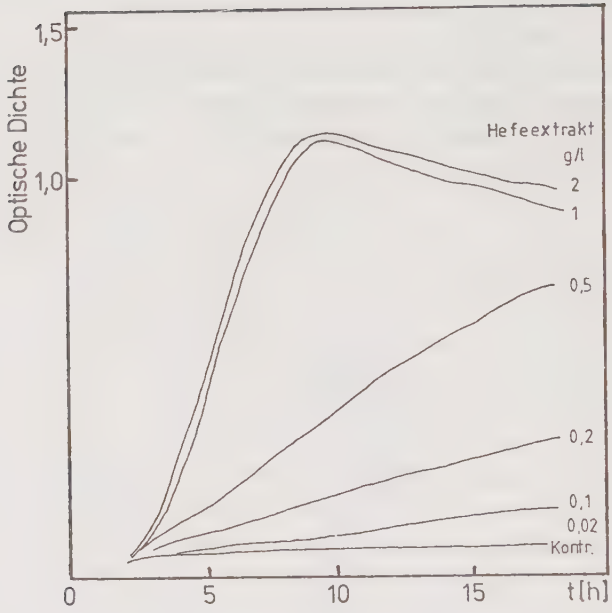


Abb. 8: Wachstum der Mutante 13 auf unterschiedlichen Konzentrationen von Hefeextrakt in MM bei 50°C und pH 4.

Zunächst wurde vermutet, daß der Hefeextrakt Substanzen enthält, die die Synthese der Cyclohexanfettsäure fördern, was jedoch durch das FS-Muster dieser Kulturen widerlegt wurde:

Kontrolle ohne Cyclohexancarbonsäure, ohne Hefeextrakt	45% cycl. FS	kein Wachstum
Kultur mit Hefeextrakt (1 g/l)	14% cycl. FS	Wachstum
Kultur mit Hefeextrakt und Cyclohexancarbonsäure	80% cycl. FS	Wachstum
Kultur mit Cyclohexancarbonsäure	76% cycl. FS	Wachstum

Die Hefeextraktkulturen enthielten fast nur die ansonsten beim Wildtyp in geringeren Mengen vorhandenen verzweigten und geradkettigen FS. Der wachstumsfördernde Faktor im Hefeextrakt wirkt

also nicht auf die Synthese der Cyclohexanfettsäuren.
Um diesen Faktor zu identifizieren, wurden parallel verschiedene Strategien angewandt:

a) Fütterung einzelner Hefeextraktkomponenten (SMITH et al. 1975, JUNI et al. 1984), Spurenelemente, Vitamine, Aminosäuren, DNA-Basen in entsprechenden Konzentrationen.

b) Extraktion lipophiler Substanzen aus Hefeextrakt mit Aceton, Ethylacetat und Chloroform. Die Extrakte wurden nach dem Einengen in Wasser aufgenommen und in Konzentrationen entsprechend 1 g/l Hefeextrakt im Biophotometer getestet.

c) Extraktion von Säuren nach Ansäuern des Hefeextraktes auf pH 1,5, ansonsten wie in b).

d) DC-Auftrennung (s. 2.11.3.).

e) Ionenaustauschchromatographie (s. 2.11.1.).

f) Gelfiltration (s. 2.11.2.).

Es ergaben sich folgende Befunde:
Unter den Hefeextraktkomponenten erwiesen sich verzweigte Aminosäuren, Leucin, Isoleucin und Valin als wachstumsfördernd, allerdings in geringerem Maße als Hefeextrakt. Die extrahierten lipophilen Substanzen und Säuren hatten keine Aktivität.
Die Ionenaustauschchromatographie ergab, daß sich die gesuchte Substanz im Eluat des Kationenaustauschers (wurde etwa bei pH 6 eluiert) und im Effluat des Anionenaustauschers befand. Die Gelfiltration ergab ein Molekulargewicht von 100 - 200.
Diese Ergebnisse ließen sich durchaus auf einen gemeinsamen Nenner bringen. Aus den Fütterungsversuchen einzelner Hefeextraktkomponenten gingen die verzweigten Aminosäuren als wachstumsfördernd hervor, bei pH 4 binden sie an den Kationenaustauscher und werden in der Gegend des isoelektrischen Punktes eluiert, ihr Molekulargewicht stimmt mit dem der Gelfiltration überein.
Die Wirkungsweise der verzweigten Aminosäuren beruht auf ihrer Funktion als Vorstufe für iso- und anteisoverzweigte FS, die sich biosynthetisch aus dem Stoffwechsel dieser Aminosäuren ableiten (KANEDA 1977). Bei B. acidocaldarius, der im Gegensatz zu den anderen Bacillus-Arten nur geringe Men-

gen dieser FS besitzt, ist der Stoffwechsel der verzweigten Aminosäuren demnach nicht in der Lage, dem erhöhten Bedarf an verzweigten Vorstufen nachzukommen, wenn die Cyclohexanfettsäuren wie bei der Mutante 13 fehlen. Daß die Wachstumsrate auf den verzweigten Aminosäuren im Fütterungsexperiment zunächst gering war, verglichen mit Hefeextrakt, war auf die Konzentrationen bzw. auf das Mischungsverhältnis der in Pools gefütterten Aminosäuren zurückzuführen. Zunächst wurden die Aminosäuren einzeln und in Kombinationen der Mutante gefüttert. Bestes Wachstum wurde erzielt mit Leucin sowie mit Kombinationen von Leucin und Isoleucin (Abb. 9). Der Einfluß von Valin war etwas unklar. Mit Valin allein wuchsen die Kulturen schlecht, in den meisten Kombinationen wirkte es eher hemmend, während sich sein Vorhandensein in Kombinationen mit Leucin und Isoleucin nicht bemerkbar machte.

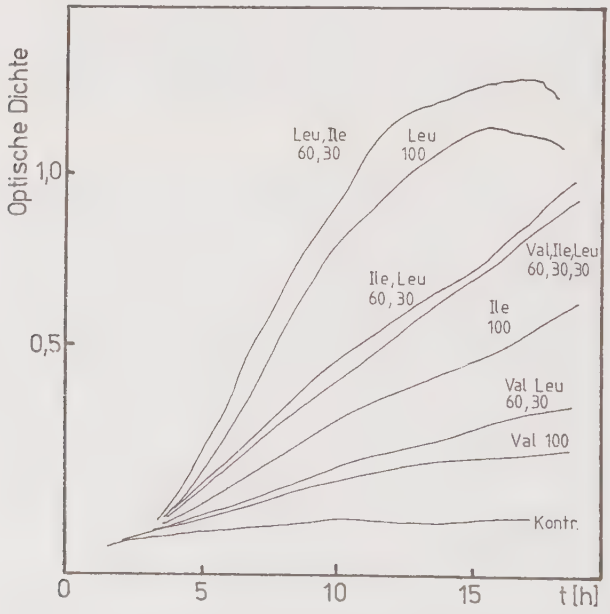


Abb. 9: Wachstum vom M 13 auf den verzweigten Aminosäuren, MM, 50°C, pH 4. Die Zahlenangaben sind mg/l.

Die optimalen Konzentrationen ergaben sich bei Leucin und Isoleucin mit 100 mg/l (ca.1 mM), auch höhere Konzentrationen hatten keine negativen Auswirkungen. Valin förderte das Wachstum sehr schlecht.
Beim Wildtyp führt der Zusatz von Valin ins Medium zu einer verminderten Wachstumsrate. Denkbar wäre ein Einfluß von Valin auf die Regulation der Biosynthese der drei verzweigten Aminosäuren, da diese einige Biosyntheseenzyme gemeinsam haben. DE ROSA et al. (1974) konnten keinen Einbau von Valin in die entsprechenden FS beim Wildtyp feststellen, bei der Mutante muß jedoch eine zumindest geringe Verwertung stattfinden, da das Wachstum mit Valin besser war als ohne. Als weitere Startermoleküle für verzweigte FS kommen die kurzkettigen FS Isocapronsäure, Isovaleriansäure und 2-Methylbuttersäure in Frage (KANEDA 1977) (Abb. 10). Bei Konzentrationen von 0,4 mM war nur ein sehr mäßiges Wachstum festzustellen, überhaupt üben kurzkettige FS ab etwa 0,5 mM einen wachstumshemmenden Effekt auf Mutante und Wildtyp aus, der auch beim Füttern von Cyclohexancarbonsäure zu beobachten ist.

Ferner kommen nach KANEDA (1977) als FS-Vorstufen die den Aminosäuren entsprechenden α-Ketosäuren in Frage (Abb. 10). α-Ketoisovalerat, α-Ketoisocaproat und α-Keto-β-methylvalerat wurden von der Mutante gut verwertet, wobei α-Ketoisovalerat analog Valin schlechter förderte. Die optimalen Konzentrationen lagen bei allen drei Vorstufen im Bereich von 0,5 mM, Wachstumshemmung war bereits bei 1 mM stark ausgeprägt.
Für die weiteren Versuche wurden als Vorstufe für verzweigte FS die verzweigten Aminosäuren eingesetzt. Hier waren im Gegensatz zu kurzkettigen FS und den α-Ketosäuren keine Hemmeffekte auf das Wachstum bei höheren Konzentrationen zu beobachten. Gemäß der wachstumsfördernden Wirkung wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: Leu 200 mg/l, Ile 100 mg/l, Val 50 mg/l. Diese Mengenverhältnisse erwiesen sich auch bei hohen Temperaturen (60°C) als optimal. Mit Hilfe der natürlichen FS-Vorstufe Cyclohexancarbonsäure und den verzweigten Aminosäuren konnten nun in ein und derselben Mutante zwei grundsätzlich unterschiedliche FS-Muster erzeugt werden, nämlich einerseits das des Wildtyps mit Cyclohexanfettsäuren

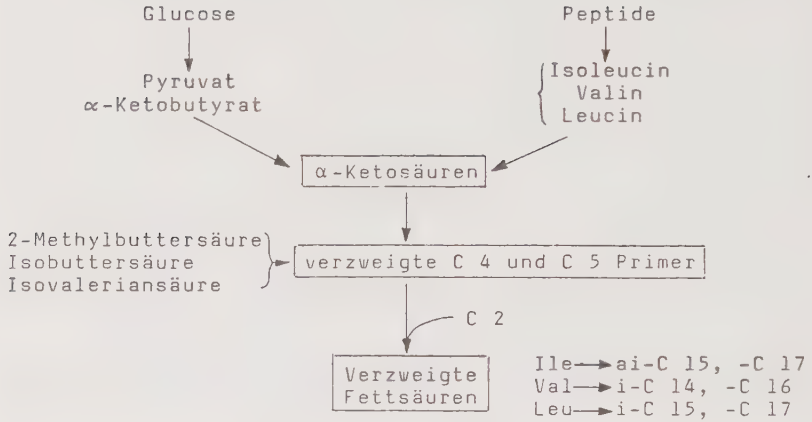


Abb. 10: Biosynthese der verzweigten Fettsäuren (KENEDA 1977)

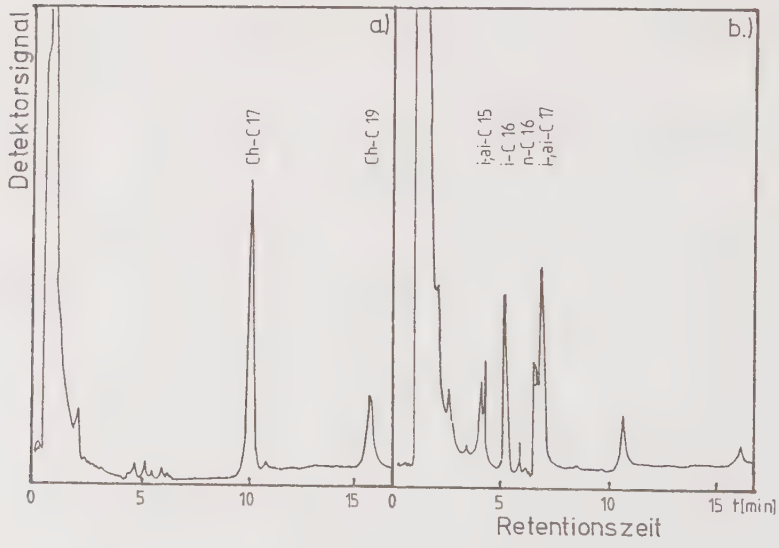


Abb. 11: Gaschromatogramme der FS-Muster der Mutante 13, bei 50°C, pH 4,
a) gefüttert mit Cyclohexancarbonsäure
b) gefüttert mit verzweigten Aminosäuren.

als Hauptkomponente und ein FS-Muster bestehend im wesentlichen aus iso- und anteiso-FS mit Kettenlängen zwischen C 15 und C 17 (Abb. 11). Durch Vergleich der physiologischen Leistungen der Mutante mit diesen beiden FS-Mustern können Rückschlüsse gezogen werden auf die Funktion der Cyclohexanfettsäuren.
Beeinträchtigt wurden die Versuche durch das permanente Vorhandensein geringer Mengen von Cyclohexanfettsäuren bei den Mutanten mit verzweigten FS. Da die Vorkultur, um das Entstehen von Revertanten zu vermeiden, mit Cyclohexancarbonsäure supplementiert war, wurde zunächst angenommen, daß dadurch der geringe Anteil cyclischer FS bei den mit der Vorkultur angeimpften Versuchskulturen verursacht wurde. Jedoch konnte der Prozentsatz cyclischer FS auch durch mehrfaches Subkultivieren der Kulturen auf verzweigten Aminosäuren nicht gesenkt werden.
Es muß also davon ausgegangen werden, daß die Biosynthese von Cyclohexancarbonsäure durch die Mutation nicht vollständig blockiert ist und eine gewisse Menge immer noch produziert wird. Dafür spricht das vermehrte Auftreten dieser FS bei langsamem Wachstum auf Aminosäuren in Minimalmedium, während bei schnellem Wachstum auf Hefeextraktmedium der Anteil unter 5% zurückgeht.
Diese Eigenschaft der Mutante 13 führte letztendlich zu einem zweiten Mutantenscreening.

3.4.2.3. Verwertung verschiedener Fettsäure-Vorstufen

Die verzweigten Aminosäuren werden jeweils annähernd gleichschnell in FS umgewandelt. Kulturen mit 75% Cyclohexanfettsäuren, die sechs Stunden während der logarithmischen Wachstumsphase mit jeweils einer der Aminosäuren (0,8 mM) inkubiert wurden (54°C, pH 4), hatten pro 30 mg Zelltrockengewicht 0,3 mg iso-C-15/-C-17-FS (von Leucin), 0,24 mg anteiso-C-15-/-C17-FS (von Isoleucin) und 0,31 mg iso-C-14-/-C-16-FS (von Valin) eingebaut. Die FS-Synthase hat demnach für alle Vorstufen eine ähnliche Spezifität, so daß das FS-Muster sehr stark durch die Mengenverhältnisse der extern angebotenen Vorstufen beeinflußt werden kann.

Nach DE ROSA et al. (1974) werden von B. acidocaldarius eine Vielzahl von Vorstufen in FS eingebaut, darunter auch von Cyclohexancarbonsäure abweichende Ringsysteme.
Die Mutante konnte auf Cyclopentancarbonsäure und Cycloheptancarbonsäure wachsen.
Das Wachstum auf Cycloheptancarbonsäure, die in gleicher Konzentration wie Cyclohexancarbonsäure eingesetzt wurde, war bei 50°C und 60°C und bei pH-Werten zwischen 5 und 2,5 genausogut wie bei Verwendung der natürlichen Vorstufe.
Die Wachstumsrate auf Cyclopentancarbonsäure war bei allen Umweltbedingungen geringer als auf der physiologischen Vorstufe.
Als FS treten bei Fütterung des 7er-Ringes Cycloheptanfettsäuren mit Kettenlängen von C 18 und C 20 auf, der 5er-Ring ergab Cyclopentanfettsäuren, C 16 und C 18 lang, wobei die längere FS dominierte.

3.4.2.4. Wachstum der Mutante bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen

Im Biophotometer wurde auf Glucose-Minimalmedium das Wachstum der Mutante mit unterschiedlichem FS-Muster in Abhängigkeit verschiedener Temperaturen und pH-Werte untersucht. Die Temperatur wurde nach Anwachsen der Zellen auf den endgültigen Wert innerhalb einer Stunde eingestellt, der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren der Biophotometerröhrchen einreguliert.
Aus Abb. 12 läßt sich entnehmen, daß die Mutante mit cyclischen FS bei extremen Umweltbedingungen eine höhere Wachstumsrate hat als die Zellen mit verzweigten FS. Diese wachsen bei 62°C überhaupt nicht mehr, bei niederen Temperaturen ist das Wachstumsoptimum zu höheren pH-Werten hin verschoben, verglichen mit der Mutante mit cyclischen FS. Die Mutante mit cyclischen FS wies ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstumsverhalten auf, ausgenommen die Werte bei 62°C, wo der Wildtyp noch bei wesentlich niedrigeren pH-Werten zu wachsen vermochte.
Um die Reaktion der Mutante auf rasche Änderungen der Umweltbedingungen zu verfolgen, wurden Temperaturschockexperimente

durchgeführt. Hierfür wurden wachsende Kulturen der Mutanten mit unterschiedlichem FS-Muster im Biophotometer bei pH 4 von 55°C innerhalb von 20 Minuten auf 73°C erhitzt und nach einer Stunde wieder abgekühlt auf 55°C. Das Ergebnis war widersprüchlich. Der Versuch wurde mehrere Male wiederholt, in einigen Fällen wuchsen die Mutanten unabhängig vom FS-Muster nach einer mehrstündigen lag-Phase weiter, in anderen Fällen wuchsen die Mutanten nur noch mit cyclischen FS nach der Hitzebehandlung. Im Verlaufe der langen lag-Phase traten häufig Revertanten mit Wildtyp-Eigenschaften auf.

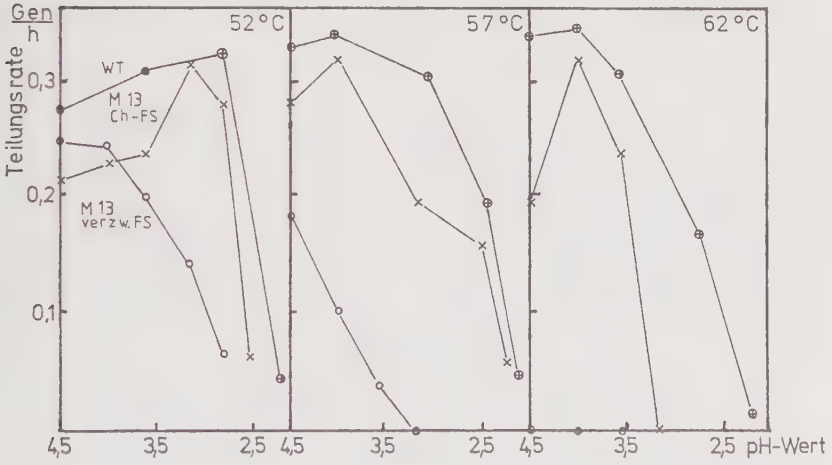


Abb. 12: Teilungsrate von Mutante 13 und des Wildtyps bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten in Minimalmedium.

3.4.2.5. Resistente gegen Azaleucin

Da es sich nicht sicher ausschließen ließ, daß das bei den extremen Bedingungen schlechtere Wachstum der Mutanten mit verzweigten FS nur durch die verminderte Aufnahme der Aminosäuren in die Zelle bedingt war, wurde versucht Überproduzenten von Leucin zu finden, die dann eventuell keiner externen Fütterung von FS-Vorstufen bedürfen. Hierfür wurde ein

Strukturanaloges von Leucin, 4-Azaleucin, eingesetzt, gegen das resistente Mutanten isoliert wurden (WARD & ZAHLER 1973, STIEGLITZ & CALVO 1971). B. subtilis wurde ab 80 mg/l gehemmt (WARD & ZAHLER 1973), beim Wildtyp trat in Flüssigkultur totale Wachstumshemmung bei 200 mg/l auf, sie ließ sich durch Leucin, 200 mg/l, aufheben, auf Platten hemmten 600 mg/l. Die 20 isolierten Mutanten erwiesen sich auch in Flüssigkultur als resistent gegen das Strukturanaloge, jedoch mußten immer noch die FS-Vorstufen gefüttert werden, um das Wachstum zu ermöglichen. Da eine Azaleucinresistenz nicht gleichzeitig eine Überproduktion von Leucin bedeuten muß, hätten diese Mutanten noch genauer charakterisiert werden müssen, was jedoch im Rahmen dieser Arbeit zu aufwendig erschien.

3.4.2.6. Atmungsrate der Mutante 13

Die Temperaturschockversuche lieferten kein eindeutiges Bild bezüglich der Lebensfähigkeit der Mutante bei Änderung der Umweltbedingungen in Abhängigkeit des FS-Musters. Eine empfindliche Methode, den Zustand der Zellen zu verfolgen bei pH- und Temperaturänderungen ist die Messung der Atmungsrate. Der Sauerstoffverbrauch von Zellen ist bei aeroben Organismen wie B. acidocaldarius über die Atmungskette an den Substratumsatz gebunden und damit abhängig von Wachstumsrate und Zellertrag (HARRISON 1976). Änderungen in der Lebensfähigkeit sowie Änderungen des Zelltiters durch Absterben der Zellen müßten sich auf den Sauerstoffverbrauch der Kultur auswirken.
Die Messungen wurden in Hefeextraktmedium durchgeführt. Abb. 14 zeigt die Atmungsrate bei 50°C und unterschiedlichen pH-Werten, die während der Messung durch Zugabe von 0,2 N H_2SO_4 erreicht wurden. Da die Zellen für jeden Meßwert ca. 10 - 15 min inkubiert werden mußten, wurde, um den O_2-Verbrauch gering zu halten, eine sehr geringe Zelldichte mit einer OD von 0,1 - 0,2 eingesetzt; die OD wurde innerhalb einer Versuchsreihe durch ständiges Verdünnen der Kultur mit temperiertem Medium konstant gehalten. Der Sauerstoffverbrauch wurde unter der Annahme einer linearen Abhängigkeit zwischen OD und Zellmasse bei geringen Zelldichten auf eine OD von 0,2 bezogen.
Wie aus Abb. 14 ersichtlich ist, können die Zellen noch bei

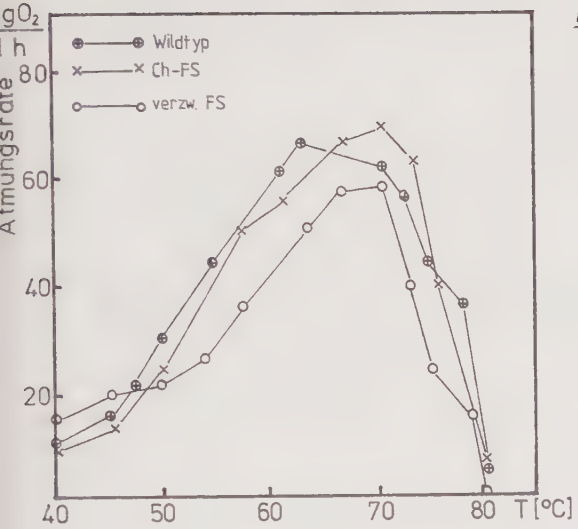


Abb. 13: Atmungsrate der Mutante mit unterschiedlich FS-Muster und Wildtyp bei verschiedenen Temperature Sporulationsmedium, pH 4.

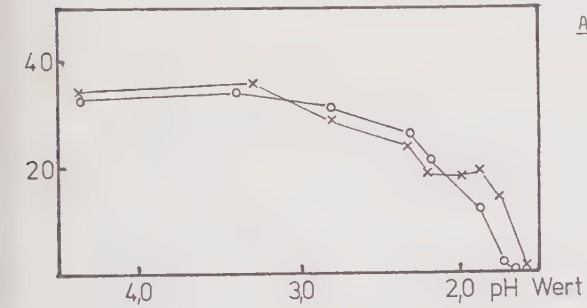


Abb. 14: Atmungsrate der Mutante mit unterschiedlich FS-Muster bei verschiedenen pH-Werten und 50°C. Sporulationsmedium.

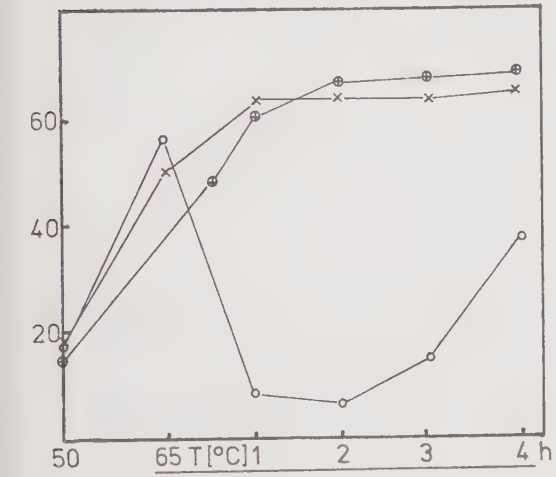


Abb. 15: Atmungsrate der Mutante mit unterschiedliche FS-Muster und des Wildtyps nach Temperatursprung, pH Sporulationsmedium.

sehr niedrigen pH-Werten zumindest während der Versuchsdauer überleben, leichte Vorteile für die Mutante mit cyclischen FS ergeben sich bei niedrigen pH-Werten kurz bevor die Zellen die Atmung einstellen. Die pH-Werte wurden bei Versuchstemperaturen gemessen.

Abb. 13 zeigt die Atmungsrate bei unterschiedlichen, steigenden Temperaturen (pH 4). Die Temperatur der Kolbenkulturen wurde innerhalb von 4 Stunden von 40 auf 80°C gesteigert. Auch hier ist erkennbar, daß die Zellen außerhalb ihres normalen Wachstumsbereiches bei Temperaturen bis ca. 80°C zu leben vermögen. Längere Inkubation bei diesen Bedingungen führt zum Absinken der Atmungsrate und zum Zelltod (nach 15 - 30 min). Die Mutante mit verzweigten FS ist wiederum etwas empfindlicher gegenüber den extremen Bedingungen als die mit cyclischen FS und der Wildtyp.

Deutliche Unterschiede ergeben sich bei schneller Temperaturerhöhung innerhalb von 15 min von 50 auf 65°C. Wie aus Abb. 15 ersichtlich ist, erhöht sich die Atmungsintensität zunächst bei Temperaturerhöhung, pendelt sich bei Wildtyp und Mutante mit cyclischen FS auf einem konstanten Niveau ein, während bei der Mutante mit verzweigten FS die Atmungsrate sehr stark zurückgeht und erst nach 2 - 3 Stunden wieder zunimmt. Das Kulturwachstum verhält sich entsprechend.

Eine weitere Subkultivierung der Mutante mit verzweigten FS ergab keine Hinweise auf das Vorhandensein von Revertanten, die das Wiederansteigen der Atmungsrate verursacht haben könnten, so daß das Verhalten der Mutante als ein Adaptationsvorgang gewertet werden muß. Der Versuch erwies sich als reproduzierbar.

Interessante Aspekte eröffnete das FS-Muster:

30 mg Zellen enthielten

	bei 50°C 1,14 mg FS	bei 65°C 0,68 mg FS
davon verzweigte	0,9 (79%)	0,40 mg (59%)
davon cyclische	0,04 (4%)	0,07 mg (10%)
Verhältnis $\frac{\text{verzw.}}{\text{cycl.}}$	$= \frac{22,5}{1}$	$= \frac{5,9}{1}$

Auffällig ist die Abnahme der Gesamtmenge der FS bei gleichzeitiger Zunahme der Cyclohexanfettsäuren, wobei sich das Verhältnis dieser zu den verzweigten drastisch ändert.

Das FS-Muster des Wildtyps zeigt bei den gleichen Versuchsbedingungen ähnliche Tendenzen.

30 mg Zellen enthielten

	bei 50°C 1,08 mg FS	bei 65°C 0,95 mg FS
davon verzweigte	0,37 mg (34%)	0,05 mg (5%)
davon cyclische	0,71 mg (66%)	0,90 mg (97%)
Verhältnis $\frac{\text{verzw.}}{\text{cycl.}}$	$= \frac{0,51}{1}$	$= \frac{0,05}{1}$

Hier nimmt jedoch die Gesamtfettsäuremenge nur wenig ab, während ebenfalls das Verhältnis der FS-Typen geändert wird als Antwort auf den Temperatursprung.
Eine mögliche Erklärung wäre die temperaturabhängige Synthese verzweigter FS, die die drastischen Effekte bei der Mutante erklären würde. Eine verminderte Aufnahme der verzweigten Aminosäuren ist weniger wahrscheinlich, da auch erhöhte Vorstufenkonzentrationen das Versuchsergebnis nicht veränderten.

3.4.2.7. ATP-Bestimmungen

Mit der Bestimmung des zellulären ATP-Gehaltes ist eine weitere empfindliche Methode gegeben, um rasche Änderungen im Zellstoffwechsel nachzuweisen. Der ATP-Level und der damit verbundene Energieladungszustand der Zelle ist eng mit der Lebensfähigkeit der Zellen gekoppelt, er ist abhängig von einer Vielzahl zellulärer Aktivitäten, z.B. von der Wachstumsrate und der Wachstumsphase (CHAPMAN & ATKINSON 1977).
Die für den Wildtyp von B. acidocaldarius bestimmten Werte lagen in dem für Mikroorganismen üblichen Bereich, bei höheren Temperaturen etwas darüber. Bei 50°C, pH 4 lag der ATP-Gehalt der Zellen bei 5,5 nmol/mg Trockengewicht, bei 65°C zwischen 9,2 nmol/mg Trockengewicht (OD 1,3) und 16,7 nmol/mg Trockengewicht (OD 2,9), Kolbenkulturen in Hefeextraktmedium.

Der ATP-Gehalt der Mutante wurde während und nach dem Temperatursprung von 50 auf 65°C gemessen. Hier zeigten sich bereits bei der Messung der Atmungsrate deutliche Differenzen, abhängig vom FS-Muster der Mutanten, die sich auch im ATP-Gehalt widerspiegeln (Abb. 16). Beim Temperaturanstieg fällt der ATP-Gehalt in den Zellen bei der Mutante mit ver-

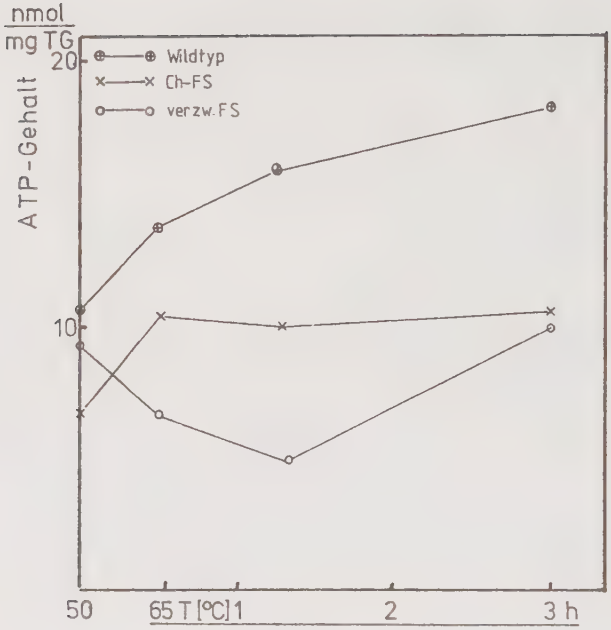


Abb. 16: ATP-Gehalt der Mutante mit unterschiedlichen FS-Mustern und des Wildtyps bei Temperatursprung von 50 auf 65°C, pH 4, Sporulationsmedium.

zweigten FS analog der Atmungsrate ab auf einen Wert, der etwa halb so groß wie der Anfangswert ist. Nach etwa 3 Stunden ist der ATP-Gehalt wieder auf dem Niveau der Mutante mit cyclischen FS, die jedoch weniger ATP als der Wildtyp enthält.
Die Abnahme des zellulären ATPs könnte eine Schädigung des Energiehaushaltes der Zellen als Ursache haben, oder aber aus einem erhöhten Verbrauch bei der Adaptation an die neuen Temperaturverhältnisse resultieren.

3.4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse von Mutante 13

Es konnte eine Mutante isoliert werden, die nur in Gegenwart einer Vorstufe für die FS-Synthese wachsen kann. Durch Füttern entsprechender Startermoleküle konnte entweder das

normale FS-Muster mit cyclischen FS erzeugt werden oder ein FS-Muster mit verzweigten FS, das bei vielen, auch thermophilen Bakterien üblich ist. Bei Wachstumsversuchen unter verschiedenen Umweltbedingungen ergaben sich für die Mutante mit cyclischen FS besonders bei extremen Bedingungen wie hohe Temperatur und niederer pH-Wert, sowie bei schnellen Änderungen der Umweltbedingungen Vorteile gegenüber der Mutante mit verzweigten FS.
Das häufige Auftreten von Revertanten mit Wildtyp-Eigenschaften ließ darauf schließen, daß es sich um eine einzige Mutation bei der Mutante handelt. Da besonders bei langsamem Wachstum der Mutante mit verzweigten FS auf Minimalmedium immer noch ein relativ großer Anteil (10-20%) cyclischer FS vorhanden war, muß davon ausgegangen werden, daß die Mutation nicht zu einer totalen Blockierung der Biosynthese dieser FS führte, sondern die Zellen immer noch eine geringe Synthesekapazität haben. Beim Wachstum auf komplexen Medien (mit Hefeextrakt) nimmt aufgrund der höheren Wachstumsrate die Menge cyclischer FS bei der mit verzweigten Vorstufen gefütterten Mutante ab auf unter 5%, jedoch werden die Unterschiede der physiologischen Leistungen der Mutanten mit unterschiedlichem FS-Muster kleiner, was darauf hindeutet, daß die Zellen mit verzweigten FS in Gegenwart eines reichen Angebotes organischer Substanzen im Medium besser zurechtkommen. Auch der Wildtyp wächst in Hefeextraktmedium schneller als in Minimalmedium.
Aus diesem Grunde erschien es sinnvoll, vergleichende Experimente in synthetischem Medium durchzuführen, und es wurde versucht, in einem zweiten Mutantenscreening cyclohexanfettsäureauxotrophe Mutanten zu finden, mit denen eine eindeutigere Membranfettsäurezusammensetzung zu erreichen ist.

3.5. MUTANTEN AUS DEM ZWEITEN SCREENING

3.5.1. Zweites Mutantenscreening

Da die Ausbeute der gewünschten Mutanten beim ersten Screening recht mager war, wurde dieses Mal zunächst ein anderes Mutagen verwendet, nämlich Nitrosoguanidin. Dieses wird bei Mikroorganismen wesentlich häufiger verwendet als EMS und die Einsatzbedingungen sind deshalb auch besser untersucht

(ADELBERG et al. 1965, SÜSSMUTH & LINGENS 1969). Nitrosoguanidin wurde auch bei Thermophilen mit Erfolg eingestzt (KIENER et al. 1984). Da aus den Literaturangaben ein optimaler pH von 6 zu ermitteln ist, wurde die Mutagenese am oberen Rand des pH-Wachstumsbereiches durchgeführt. Es wurde gleichzeitig auf Cyclohexancarbonsäure- und Shikimisäure-Auxotrophie selektioniert. Bei den Mutagenesen mit NG wurde eine sehr geringe Gesamtrate der Auxotrophie festgestellt beim Vergleich von Komplexmediumplatten mit überstempelten Minimalmediumplatten. Die Rate lag unter 1% und war damit wesentlich kleiner als bei EMS-Behandlung und weit von den Literaturangaben (10%) entfernt. Die Absterberate in Abhängigkeit der Zeit entsprach ebenfalls nicht den Erwartungen. Zwischen der Kontrollkultur und einer NG-behandelten Kultur sank die Lebendzellzahl nach 20 min um 40%, veränderte sich aber bei längerer Einwirkungszeit nicht mehr. Eine solche Absterbekinetik wurde auch bei E. coli beobachtet (ADELBERG et al. 1965), jedoch konnten bei B. acidocaldarius keine auxotrophen Mutanten gefunden werden, die nur noch auf Komplexmedium wuchsen. Da auch bei weiteren Mutagenesen unter variierten Bedingungen nur eine mit EMS verglichen geringe Zahl auxotropher Mutanten festgestellt werden konnte, wurde für weitere Versuche wieder auf EMS zurückgegriffen.
Auf Anreicherungsschritte mit Antibiotika, die auf wachsende Zellen wirken, wurde verzichtet; die Zellen wurden nach der Mutagenese in Komplexmedium mit den entsprechenden Supplementen einige Generationen inkubiert und für die Mutantenselektion in entsprechenden Verdünnungen auf Agarplatten ausgestrichen.
Mit wenigen EMS-Mutagenesen konnte eine gute Ausbeute an den gewünschten Mutanten erzielt werden. Bei insgesamt drei Durchgängen wurden 10 cyclohexancarbonsäure- und 4 shikimisäureauxotrophe Mutanten selektioniert, deren Auxotrophie sich im Biophotometer bestätigte. Die Mutanten hatten die gleichen Ansprüche bezüglich der FS-Vorstufe wie die beim ersten Mutantenscreening isolierte Mutante. Sie wuchsen entweder mit Cyclohexancarbonsäure oder mit verzweigten Aminosäuren. Es ist also offensichtlich eine generelle Eigenschaft von B. acidocaldarius, daß der Metabolismus der

verzweigten Aminosäuren den Bedarf an FS-Vorstufen ohne die cyclischen FS nicht decken kann.
Die Mutanten wurden kloniert und auf Platten mit Minimalmedium ohne Vorstufe getestet. Außerdem wurden die Mutanten im Kolben mit Hefeextrakt und verzweigten Aminosäuren angezogen, am Ende der logarithmischen Phase auf einen weiteren Kolben übergeimpft und von beiden Kulturen das FS-Muster bestimmt.
Aus diesen Tests gingen 4 Stämme hervor (C 2, 7, 8, 10), die auf Minimalmedium ohne Vorstufe nicht wachsen konnten sowie geringe Reversionsraten besaßen, und die ein FS-Muster zeigten mit einem Gehalt cyclischer FS unter 2%. Diese 4 Stämme wurden für die weiteren Versuche verwendet. Da jedoch nicht jeder Versuch mit allen vier Mutanten durchgeführt werden konnte, wurden im wesentlichen C 2 und C 7 verwendet.
Bei C 10 gab es des öfteren Schwierigkeiten bezüglich des Anwachsens bei Änderung der Versuchsbedingungen, z.B. beim Animpfen der Versuchskulturen mit der gewaschenen Vorkultur. Da dieses Phänomen jedoch nicht regelmäßig auftrat, konnte dessen Ursache nicht näher definiert werden.

3.5.2. Shikimisäureauxotrophe Mutanten

Die shikimisäureauxotrophen Stämme (S 6, 16, 17, 31) wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Ansprüche an Supplementen untersucht. Shikimisäure- bzw. aromatenauxotrophe Bakterien wurden seinerzeit benutzt, um den Biosyntheseweg der aromatischen Aminosäuren aufzuklären (DAVIS 1952, HASLAM 1974).
Als Endprodukte der Aromatenbiosynthese wurden folgende Substanzen in Form einer Aromatenstammlösung verfüttert:

Phenylalanin	100 mg/l
Tryptophan	100 mg/l
Thyrosin	50 mg/l
p-Aminobenzoesäure	20 mg/l
2,3-Dihydroxybenzoesäure	10 mg/l

Chinasäure, die in einem Seitenzweig der Aromatenbiosynthese steht, wurde in Konzentrationen von 200 mg/l angeboten.

Aus Abb. 17 ist ersichtlich, daß die shikimisäureauxotrophe Mutante C 16 am besten auf Shikimisäure selbst wächst. Wachstum auf Aromaten findet nur statt in Gegenwart von FS-Vorstufen, wobei interessanterweise das Wachstum auf verzweigten Aminosäuren besser ist als auf Cyclohexancarbonsäure. Die Wachstumsrate auf Shikimisäure konnte durch Füttern von Aromaten und FS-Vorstufen in verschiedenen Konzentrationen nicht erreicht werden, vielleicht hätten Variationen innerhalb der Aromatenstammlösung Verbesserungen gebracht.
Da jedoch die Nährstoffansprüche dieser Mutanten insgesamt komplizierter sind als die der Cyclohexanauxotrophen, wurden die shikimisäureauxotrophen Mutanten nicht für weitere Versuche bezüglich der Cyclohexanfettsäuren verwendet.

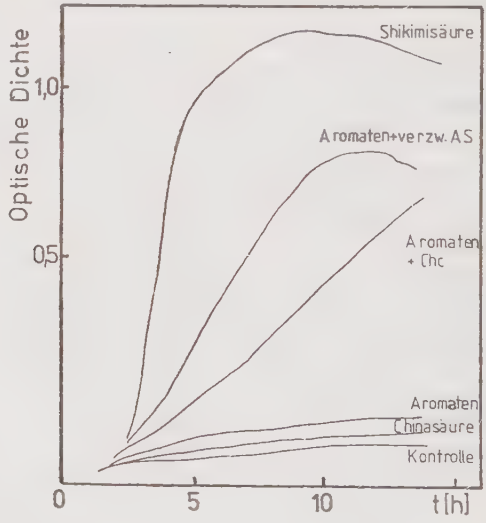


Abb. 17: Wachstum der shikimisäureauxotrophen Mutante C 16 auf verschiedenen Supplementen in MM, 50°C, pH 4. Zusammensetzung der Aromaten siehe 3.5.2.

3.5.3. Kreuzfütterung

Da nun eine größere Anzahl von Mutanten zur Verfügung stand, wurde versucht durch das gegenseitige Füttern mit ausgeschiedenen Zwischenprodukten nähere Aufschlüsse über die Lage der einzelnen Defekte in der Biosynthesekette zwischen Shikimisäure und Cyclohexancarbonsäure zu erlangen.

Zunächst wurde das konventionelle Verfahren angewendet, indem die 10 cyclohexancarbonsäureauxotrophen Mutanten nebeneinander auf Platten mit Minimalmedium ausgestrichen wurden. Außer dem Auftreten von Revertanten bei verschiedenen Stämmen konnte kein Wachstum beruhend auf gegenseitiger Fütterung beobachtet werden. Wachstum auf der Kontrollplatte mit Vorstufe fand statt. Das modifizierte Verfahren, bei dem die Mutanten beim Ausstreichen miteinander vermischt wurden, und damit kurze Diffusionswege der eventuell ausgeschiedenen Zwischenprodukte gewährleistet sind, erbrachte ebenfalls bei keiner Kombination ein positives Ergebnis.
Da Plattenversuche nicht funktionierten, wurde auf ein Testsystem mit Flüssigkulturen übergegangen. Da hier das Auftreten von Revertanten nicht mehr auf einfache Weise von der Kreuzfütterung unterschieden werden konnte, wurden zunächst nur die vier, für weitere Untersuchungen aussortierten Stämme benutzt.
Das gemeinsame Inkubieren von zwei Mutanten in einem Biophotometerröhrchen ergab folgendes Bild: Kombinationen von C 2 mit C 8 und C 10 sowie von C 7 mit C 8 und C 10 wuchsen, C 2 mit C 7 und C 8 mit C 10 wuchsen nicht.
Zum Testen der Kulturüberstände wurden die Mutanten mit verzweigten Aminosäuren über Nacht angezogen, die Zellen abzentrifugiert, das Medium (100 ml) auf pH 1,5 angesäuert und mit 100 ml Ethylacetat extrahiert. Der Rückstand wurde nach dem Einengen in 10 ml Wasser aufgenommen und in verschiedenen Konzentrationen nach pH-Einstellung gefüttert. Ergebnis: Der Kulturextrakt von C 2 und C 7 fördert jeweils das Wachstum von C 8 und C 10. Extrakte von C 8 fördern in geringerem Maße C 2 und C 7.
Die FS-Analyse der gefütterten Kulturen ergab, daß die Mutanten C 8 und C 10 Cyclohexanfettsäuren gebildet hatten, während die durch C 8 gefütterten C 2 und C 7 lediglich verzweigte FS aufwiesen. Daraus ist zu entnehmen, daß C 8 in verstärktem Maße Zwischenprodukte aus dem Aminosäurestoffwechsel ausscheidet und diese mit Ethylacetat extrahiert werden.
Zusammenfassend läßt sich sagen: Die Mutanten C 8 und C 10

müssen den Block am Anfang der Biosynthese haben, C 2 und C 7 am Ende bzw. weiter hinten, wobei bei den beiden Paaren aufgrund mangelnder gegenseitiger Fütterung der Defekt am gleichen Enzymschritt lokalisiert ist. Mit Hilfe einer geeigneten Analytik könnten die wachstumsfördernden Substanzen aus den Kulturüberständen isoliert und analysiert werden.

Es wurde versucht, potentielle Zwischenprodukte der Biosynthese mit verschiedenen Kombinationen von Hydroxylgruppen in m- und p-Stellung am Cyclohexanring durch katalytische Hydrierung entsprechender Hydroxybenzoesäurederivate herzustellen. Bei dieser Hydrierung traten jedoch eine Reihe von Produkten auf, die sich schlecht voneinander trennen ließen (DC) und deren Hauptkomponente Cyclohexancarbonsäure war, so daß es nicht möglich war, die Mutanten durch Füttern von potentiellen Zwischenprodukten weiter zu charakterisieren.

Mit den übrigen cyclohexancarbonsäureauxotrophen Mutanten konnten wegen der "leakyness" und der teilweise hohen Reversionsrate diese Versuche nicht durchgeführt werden.

3.5.4. Wachstum auf verschiedenen Fettsäure-Vorstufen

Die Versuche über die Verwendung verschiedener FS-Vorstufen bestätigen die Ergebnisse, die von der Mutante 13 erhalten wurden. Abb. 18 demonstriert die Abhängigkeit des Wachstums von C 7 bei verschiedenen Konzentrationen an Cyclohexancarbonsäure. Da die Vorkulturen mit verzweigten Aminosäuren als Vorstufe gefüttert wurden, und somit nahezu keine cyclischen FS vorhanden waren, lag die minimale Wachstumskonzentration erheblich höher (50µM) als bei M 13 (8µM). Aus diesem Grund wurden für weitere Versuche 150 µM Cyclohexancarbonsäure als Fütterungskonzentration verwendet. Das Wachstum auf den verzweigten FS wurde wiederum am besten durch Leucin gefördert, gut auch durch Isoleucin, schlechter durch Valin. Dies galt auch für höhere Temperaturen. Die Fütterungskonzentrationen wurden von M 13 übernommen.
In Abb. 19 sind die Gaschromatogramme der FS-Muster von C 7 dargestellt, gefüttert mit Cyclohexancarbonsäure und verzweigten Aminosäuren, 50°C, pH 4.
Das FS-Muster der Zellen mit verzweigten FS enthält relativ

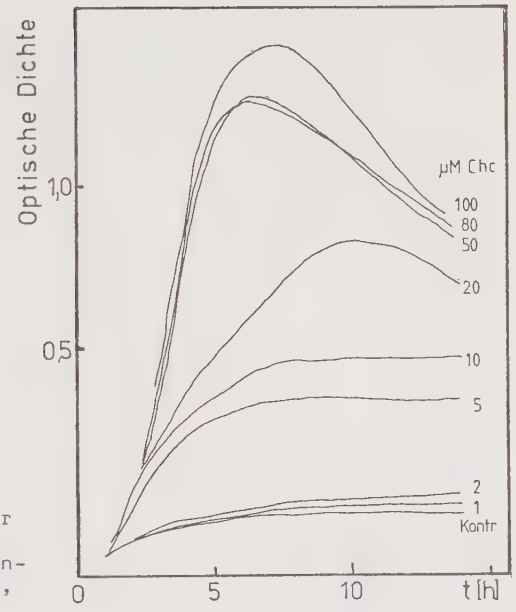


Abb. 18: Wachstum der Mutante C7 auf Cyclohexancarbonsäure, MM, 50°C, pH 4.

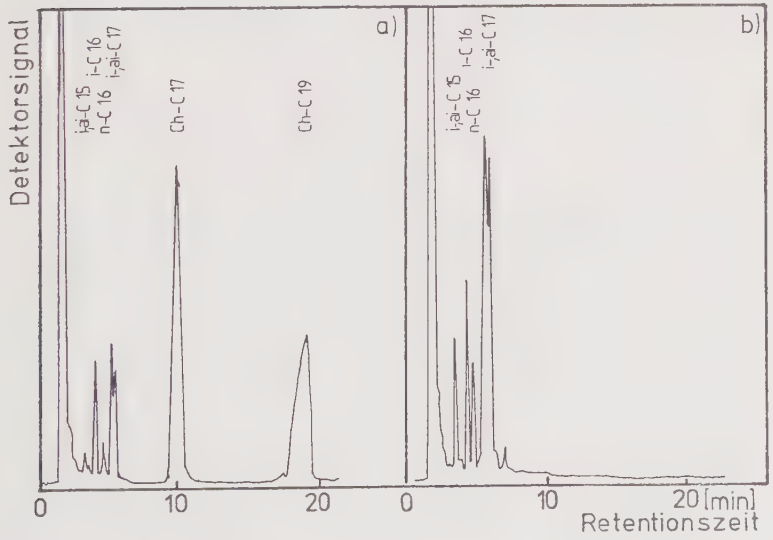


Abb. 19: Gaschromatogramme der FS-Muster von C 7 (MM, 50°C, pH 4)
a) gefüttert mit Cyclohexancarbonsäure
b) gefüttert mit verzweigten Aminosäuren.

viel der längerkettigen C-17-FS, deren Anteil bei höhren Temperaturen noch ansteigt, bzw. sich zu einem höheren Gehalt an iso-C-17 verschiebt. Die Mutanten sind also in der Lage, die Zusammensetzung der verzweigten FS in gewissen Grenzen den Umweltbedingungen anzupassen, nämlich über die Kettenlänge und die Verzweigung der FS.

Typisches FS-Muster bei	50°C	63°C	(C 7, pH 4, MM).
iso-C-15	11,3%	7,2%	
anteiso-C-15	1,7%	0,6%	
iso-C-16	10,6%	10,9%	
n-C-16	8,2%	7,4%	
iso-C-17	40,6%	50,3%	
anteiso-C-17	24,0%	19,3%	

Da bei hohen Temperaturen vermehrt iso-C-17 gebildet wird, ist es sicher sinnvoll, den Zellen viel Leucin als Vorstufe anzubieten.
Im Gegensatz zu M 13 wuchsen die Mutanten auch auf den kurzkettigen FS 2-Methylbuttersäure, Isobuttersäure und Isovaleriansäure. Da jedoch die Wachstumsrate auf diesen Substanzen schlechter war als auf den verzweigten Aminosäuren, wurden weiterhin die letzteren gefüttert, zumal die Zellen von Natur aus auf die Aufnahme von Aminosäuren als Nährstoffe aus dem Medium eingerichtet sind.
Abb. 20 zeigt das Wachstum von C 2 und C 10 auf verschiedenen cyclischen Vorstufen (0,3 mM), pH 4 bei 50 bis 65°C im Kolben. In Tab. 4 ist das FS-Muster der Kulturen dargestellt, das schlechtere Wachstum von C 2 ist vermutlich auf den geringeren Einbau der Cyclopentan-Vorstufe zurückzuführen. Wie die Gaschromatogramme (Abb.21) zeigen, wird eine bestimmte FS-Länge bevorzugt gebildet, bei Cyclopentancarbonsäure wird hauptsächlich die längerkettige C 18 (von C 16 und C 18) eingebaut, bei Cycloheptancarbonsäure die kürzerkettige C 18 (von C 18 und C 20), während bei der natürlichen Vorstufe C 17 und C 19 oft in etwa gleichen Mengen vorhanden sind. Ferner wurden Cyclohexanessigsäure, -propionsäure und -buttersäure im Biophotometer als FS-Vorstufen getestet (0,1mM, 0,2mM).

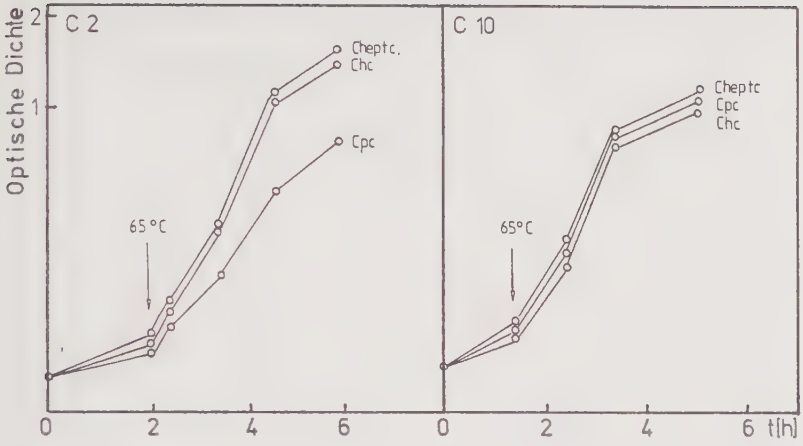


Abb. 20: Wachstum von C 2 und C 10 auf Cyclohexan-, Cyclopentan- und Cycloheptancarbonsäure bei Temperatursprung auf 65°C, pH 4, MM.

C 10 wächst bei 50°C, pH 4 auf Cyclohexancarbonsäure und -propionsäure etwa gleich schnell, mit Cyclohexanessigsäure ist nur noch die halbe Wachstumsrate erzielbar, auf Cyclohexanbuttersäure ist nur noch bei 0,1 mM geringes Wachstum festzustellen. Bei höheren Temperaturen (58°C, 63°C) ist nur noch auf Cyclohexancarbonsäure und -propion-

Tab. 4: FS-Muster von C 2 und C 10 bei Fütterung von Cyclopentan-, Cyclohexan- und Cycloheptancarbonsäure, pH 4, 65°C, MM, Vorstufenkonzentration 0,3mM.

Kultur	Ch - FS C 17	C 19	Cp - FS C 16	C 18	Chept - FS C 18	C 20	verzw. FS	mg FS/ 30mg TG
C 2 Chc	50,5	38,5					5,8	0,70
Cheptc	1				87,0	4,4	8,6	0,60
Cpc	1,5		3,8	21,7			69,2	0,63
C10 Chc	30,0	63,0					4,9	0,68
Cheptc	3,0				50,3	37,0	7,6	0,56
Cpc	3,2		8,1	78,1			7,2	0,72

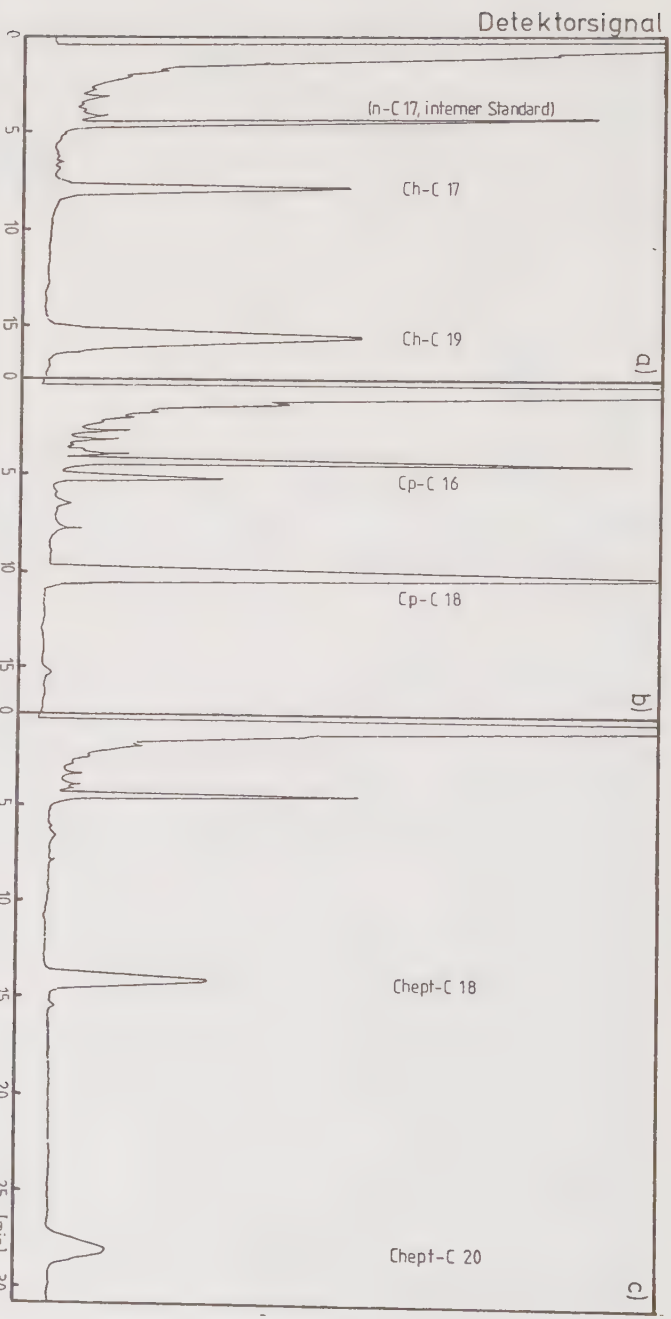


Abb. 21: Gaschromatogramme der FS-Muster der Mutante C 10 bei 65°C, pH 4
a) gefüttert mit Cyclohexancarbonsäure
b) " Cyclopentancarbonsäure
c) " Cycloheptancarbonsäure

säure befriedigendes Wachstum festzustellen. Diese beiden Vorstufen ergeben die physiologischen FS mit Kettenlängen von C 17 und C 19, während aus Cyclohexanessigsäure C 18 gebildet wird. Der Einbau von Cyclohexanbuttersäure konnte aufgrund des schlechten Wachstums der Zellen auf dieser Verbindung nicht nachgewiesen werden. Auch der Wildtyp wächst nur mit den ungeradzahligen Ringverbindungen im Medium, dagegen hemmen Cyclohexanessigsäure und noch stärker Cyclohexanbuttersäure. Bei letzterer tritt ab 0,2 mM totale Wachstumshemmung auf, die durch Cyclohexancarbonsäure nicht aufgehoben werden kann, also wahrscheinlich nicht durch den Einbau dieser Verbindung in ungeeignete FS bedingt ist.
Von Herrn Prof. Floss (Department of Chemistry, Ohio State University, Columbus) wurden mir dankenswerter Weise einige Substanzen zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Cyclohexen-1-carbonsäure (1), Cyclohexen-2-carbonsäure (2) und Cyclohexen-2,4-carbonsäure (3). Der Test erfolgte mit C 7 und C 10. Substanz 3 wird nicht verwertet, 1 wird für FS verwertet, die Doppelbindung wird jedoch zuvor entfernt, 2 wird ungesättigt in FS eingebaut, nach Hydrieren der FS-Methylester fällt der neue Peak im Gaschromatogramm mit dem Peak der Cyclohexanfettsäure zusammen. Bei Substanz 1 dürfte es sich also um eine natürliche Vorstufe handeln.
FS-Mutanten von anderen Bakterien konnten vielfach mit ganzen FS gefüttert werden (WILLE et al. 1975). Hierfür wurden aus B.-subtilis-Zellen die FS extrahiert. FS-Zusammensetzung: 42,7% iso-C-15, 34,7% anteiso-C-15, 1,7% iso-C-16, 2,5% n-C-16, 10,4% iso-C-17, 5,3% anteiso-C-17. Die FS wurden in Ethanol oder Hexan gelöst und in Konzentrationen von 12 - 240 mg/l gefüttert. Es konnte kein Wachstum der Mutanten beobachtet werden, also auch keine Aufnahme der FS. Detergenzien als Lösungsvermittler konnten nicht angewendet werden, da der Wildtyp bereits bei einem Zehntel der in der Literatur verwendeten Konzentrationen an Brij 35 und Triton-X-100 im Wachstum gehemmt wird.
Durch Füttern von geradkettigen Vorstufen wurde versucht, ein FS-Muster aus geradkettigen FS zu erzeugen. Der Ein-

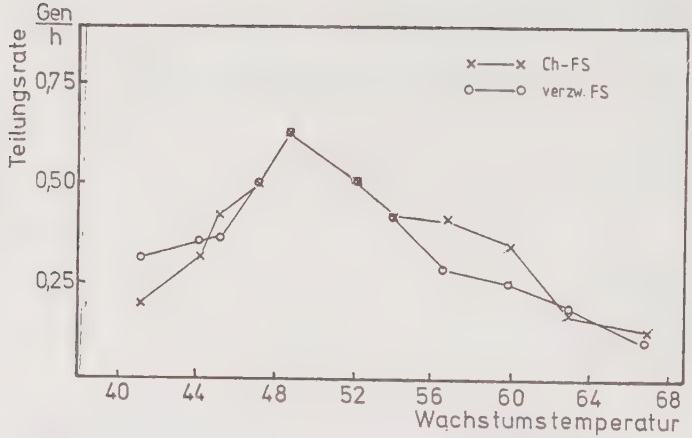


Abb. 22a: Teilungsrate von C 7 im Biophotometer bei verschiedenen Temperaturen, pH 2,6 in MM, in Abhängigkeit des FS-Musters.

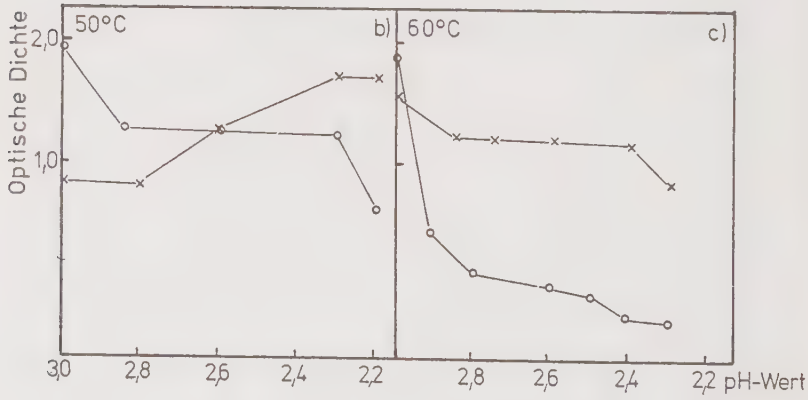


Abb. 22b, c: Wachstumsertrag von C 7 bei 50 (b) und 60°C (c) nach Einstellen niederer pH-Werte (MM), in Abhängigkeit des FS-Musters.

bau von geradkettigen FS wurde von DE ROSA et al.(1974) nachgewiesen. Im Biophotometer konnte bei allen 4 Mutanten auf Pentan- und Heptansäure (0,1-0,3 mM) allein kein Wachstum festgestellt werden. Erst durch Zufüttern geringer Mengen verzweigter Aminosäuren konnte Wachstum erzielt werden (0,2 mM Leu, 0,1 mM Ile, Val) mit einem maximalen Gehalt an 35% geradkettigen FS. Über 0,5 mM hemmten die Vorstufen bei diesen Versuchen das Wachstum. Es ist demnach nicht möglich, ein größtenteils aus geradkettigen FS bestehendes FS-Muster in den Mutanten zu erzeugen, da Wachstum nur in Gegenwart zusätzlicher verzweigter oder cyclischer FS stattfindet.
Die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche wurden erschwert bzw. verzögert durch das häufige Auftreten von Revertanten durch das auf manchen Vorstufen schlechte Wachstum der Mutanten.

3.5.5. Wachstum bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen

Die Wachstumsversuche mit den Mutanten bei verschiedenen pH- und Temperaturbedingungen wurden teils im Biophotometer, zum größeren Teil jedoch in Kolben durchgeführt. Es ist anzunehmen, daß die Biophotometerkulturen besonders bei Temperaturen über 60°C sauerstofflimitiert sind, da die Schüttelgeschwindigkeit einerseits aus technischen Gründen nicht sehr hoch gestellt werden kann, andererseits die Durchmischung durch die Form der Inkubationsröhrchen nicht optimal ist. Die Kolbenkulturen in 500 ml Schikanekolben sind sicherlich besser sauerstoffversorgt, so daß keine Beeinträchtigung der Versuche zu erwarten ist.
Abb. 22a zeigt die Teilungsrate der Mutante C 7 im Biophotometer bei verschiedenen Temperaturen und pH 2,6 in Minimalmedium. Die Mutante mit cyclischen FS wächst im oberen Temperaturbereich teilweise besser als mit verzweigten FS.
Abb. 22b,c stellt das Ergebnis eines Biophotometerversuches mit C 7 in Minimalmedium dar. Hier wurde bei 50°C und bei 60°C der pH-Wert während des Versuchs auf niedrigere Werte eingestellt und der Wachstumsertrag verfolgt. Bei niedriger Temperatur ist der Ertrag der Zellen mit verzweigten FS

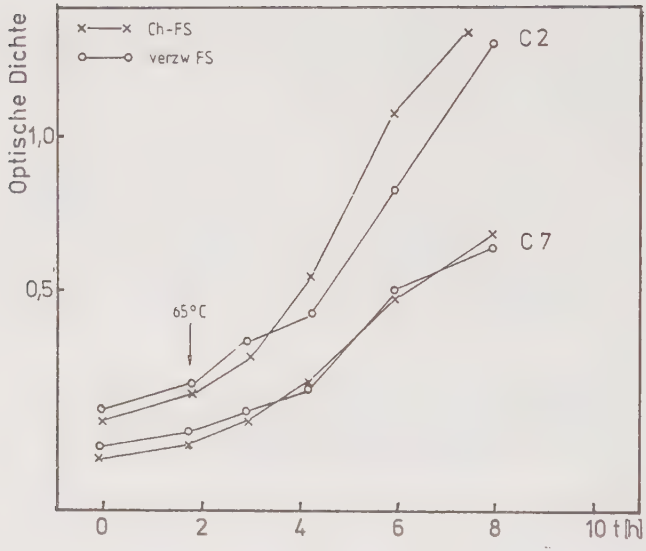


Abb. 23: Wachstum von C 2 und C 7 nach Temperatursprung auf 65°C mit unterschiedlichen FS-Mustern bei pH 4, MM.

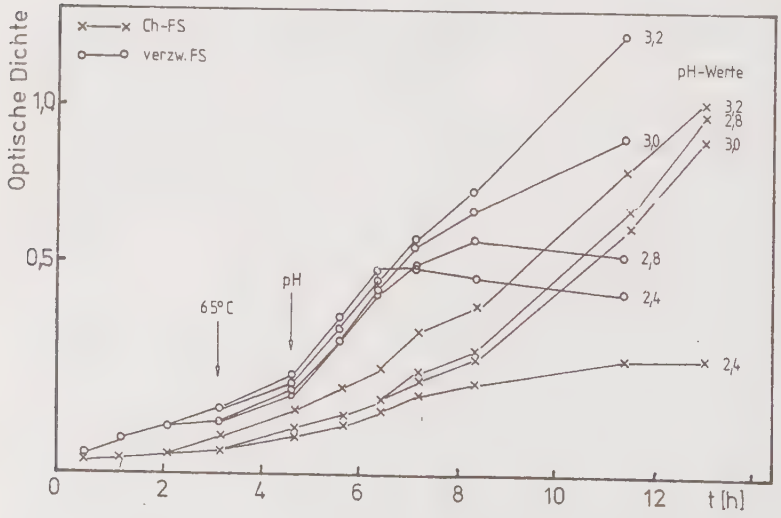


Abb. 24: Wachstum von C 2 nach Temperatursprung auf 65°C bei verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit des FS-Musters, MM.

bei hohen pH-Werten besser, während der der Zellen mit cyclischen FS bei niedrigeren pH-Werten optimaler erscheint. Bei 60°C ergeben sich für die Zellen mit Cyclohexanfettsäuren gleichbleibende Wachstumserträge über den erfaßten pH-Bereich, die Mutanten mit verzweigten FS stellen das Wachstum nach Absenken des pH-Wertes schnell ein.
Die folgenden Diagramme basieren auf Versuchen in Schüttelkolben mit Minimalmedium. Hohe Temperaturen und extreme pH-Werte wurden erst eingestellt, wenn die Kolben gut angewachsen waren und ihre Anfangs-OD mindestens verdoppelt hatten. Die Temperaturen wurden innerhalb von 30 min auf den erforderlichen Wert gebracht, der pH stufenweise in 0,3-pH-Schritten in der gleichen Zeit.
Abb.23 zeigt das Wachstum von C 2 und C 7 bei Temperaturerhöhung von 53°C auf 65°C, pH 4, MM. Es ergibt sich praktisch die gleiche Wachstumsrate bei beiden FS-Mustern, auch nach Steigerung der Temperatur.

FS-Muster von C 2 (Hauptkomponenten):

Verzweigte FS: Ch-FS 0%, 69% iso-C-17, <5% anteiso-C-17, 11% iso-C-16, 11% iso-C-15

Cyclische FS: Ch-FS 71% (57% C 17, 19% C 19)

FS-Muster von C 7:

Verzweigte FS: Ch-FS 1%, 68% iso-C-17, 5% anteiso-C-17, 12% iso-C-16, 8% iso-C-15

cyclische FS: Ch-FS 71% (28% C 17, 43% C 19)

Die Vorkulturen mit verzweigten FS hatten etwa 39% iso-C-17- und 12% anteiso-C-17-FS.

Abb. 24 dokumentiert das Wachstum in Schüttelkolben von C 2 bei Temperaturanstieg von 50 auf 65°C und verschiedenen pH-Werten. C 2, mit Cyclohexancarbonsäure gefüttert, wächst lediglich bei pH 2,4 nicht weiter; mit verzweigten Aminosäuren gefüttert ist die Wachstumsrate ab pH 3 abwärts geringer.

FS-Muster:

Verzweigte FS: bei allen vier pH-Werten 67-69% iso-, anteiso-C-17-FS, davon maximal 5% anteiso-C-17-FS

Cyclische FS:	pH	C-17-FS	C-19-FS
	3,2	70%	25%
	3,0	69	26
	2,8	68	29
	2,4	59	34

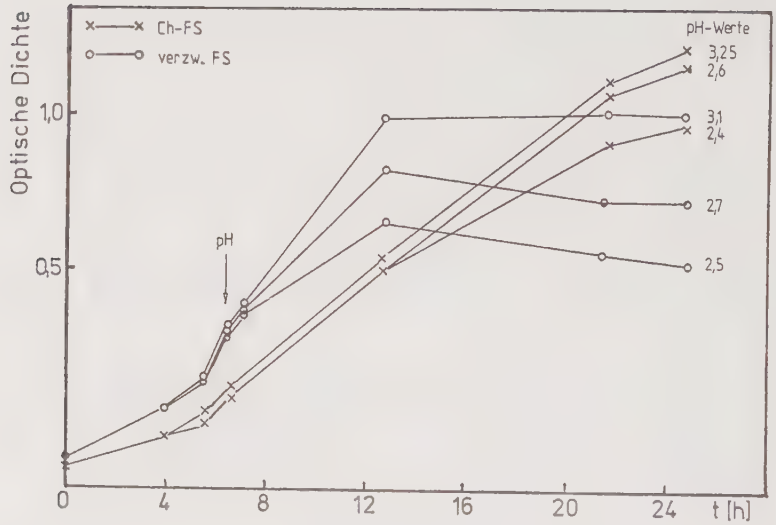


Abb. 25: Wachstum von C 7 bei 53°C und unterschiedlichen pH-Werten in Abhängigkeit des FS-Musters, MM.

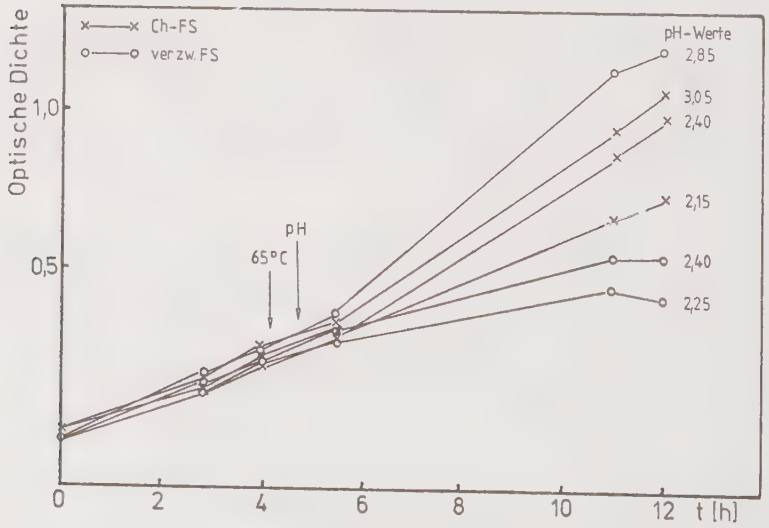


Abb. 26: Wachstum von C 7 nach Temperatursprung auf 65°C und unterschiedlichen pH-Werten in Abhängigkeit des FS-Musters, MM.

Auffällig ist der hohe Gehalt an iso-C-17-FS bei der aminosäuregefütterten Mutante sowie die Verschiebung zu einem höheren Gehalt der C-19-FS innerhalb der Cyclohexanfettsäuren bei der Mutante mit cyclischen FS bei sinkendem pH-Wert.
Abb. 25 zeigt, daß C 2 bei niederen pH-Werten bei 53°C deutlich besser mit cyclischen FS als mit verzweigten wächst. Der Abfall der Wachstumsrate tritt bei verzweigten FS direkt nach Einstellen des neuen pH-Wertes ein, während die Mutante mit cyclischen FS vom pH-Wert unbeeinflußt bleibt. Auch ohne pH-Änderung erreichen die Zellen mit verzweigten FS eine geringere End-OD.
Abb. 26 zeigt, daß C 7 bei 65°C und verschiedenen pH-Werten insgesamt das gleiche Verhalten wie C 2 (Abb. 24) aufweist. Auch hier ist ein gut erkennbarer Unterschied zwischen den Mutanten mit unterschiedlichen FS-Mustern zu sehen.

FS-Muster:

Verzweigte FS:	pH	3,0	70% iso-, anteiso-C 17			
		2,70	67%	"		davon jeweils
		2,55	62%	"		5% anteiso-C-17
Cyclische FS:	pH	3,25	72% C-17-FS		25% C-19-FS	
		2,60	63%		34%	
		2,40	65%		33%	

Abschließend für die Wachstumsversuche bei unterschiedlichen Umweltbedingungen läßt sich sagen, daß die beiden getesteten Mutanten übereinstimmende Ergebnisse lieferten. Bei beiden zeigten die Zellen mit verzweigten FS eine reduzierte Wachstumsrate bei niedrigen pH-Werten, während die Wachstumsrate bei höheren pH-Werten eher besser ist, als die der Mutante mit cyclischen FS. Dieser Effekt tritt bereits bei gemäßigten Temperaturen auf.
Beim Übergang zu hohen Temperaturen werden vermehrt iso-C-17-FS eingebaut, bei den Zellen mit cyclischen FS führt die Erniedrigung des pH-Wertes zur vermehrten Bildung der längerkettigen C-19-Cyclohexanfettsäure.
Eine Erhöhung der Konzentration an verzweigten Aminosäuren im Medium auf das Doppelte ergab kein besseres Wachstum bei niedrigen pH-Werten, so daß offenbar nicht die Aufnahme die-

ser Aminosäuren durch den pH behindert ist.
Während dieser Versuche trat einige Male der Effekt auf, daß die Mutanten mit verzweigten FS nicht mehr auf Minimalmedium plus FS-Vorstufen anwuchsen. Da Wachstum in Gegenwart von Caseinhydrolysat wieder stattfand, schien die Mutante plötzlich auxotroph für bestimmte Aminosäuren zu sein. Ein Test der verschiedenen Aminosäuren ergab gutes Wachstum auf Alanin und Threonin. Der vereinzelte zusätzliche Einsatz dieser Aminosäuren beeinflußte jedoch die obigen Versuche nicht, die Mutante konnte später wieder ohne diese Zusätze wachsen.

3.5.6. Hopanoidgehalt der Mutanten

Obgleich Änderungen der Umweltbedingungen, insbesondere der Temperatur in der Regel durch Änderungen des FS-Musters kompensiert werden (MC ELHANEY 1984, RUSSEL 1984), gibt es einige Beispiele für die temperaturinduzierte Beeinflussung des Lipidmusters (ORDONEZ et al. 1985, HURST et al. 1984, REITZER et al. 1985) sowie Änderungen der Lipidzusammensetzung in Abhängigkeit des FS-Musters der Membran (CHATTOPADHYAY et al. 1985, LOW et al. 1985, SOUZA et al. 1974, WIESLANDER & RILFORS 1977).
Um die Zusammensetzung der Mutantenmembranen bei den unterschiedlichen FS -Mustern zu untersuchen, wurden die Lipide aus Kolbenkulturen dünnschichtchromatographisch aufgetrennt, und zwar jeweils gleiche Mengen Lipid.
Abb. 27 zeigt die aufgetrennten Lipide vonC 7 (63°C, pH 4,0) mit verzweigten und cyclischen FS. Recht gut ist zu erkennen, daß sich vor allem die Flecken von Hopan-Glycolipid in ihrer Größe unterscheiden. Die anderen Lipide zeigen keine Mengenunterschiede.
Da die Glycolipide die größte Fraktion unter den Membranlipiden von B. acidocaldarius ausmachen und diese Lipide bei thermophilen Organismen eine besondere Rolle zu spielen scheinen (LANGWORTHY 1982, RAY et al. 1971), erschien es sinnvoll, sich mit dem Hopanoidgehalt der Mutante näher zu befassen.
Tab. 5 und 6 sowie Abb. 28 geben die Ergebnisse der Hopanoid-

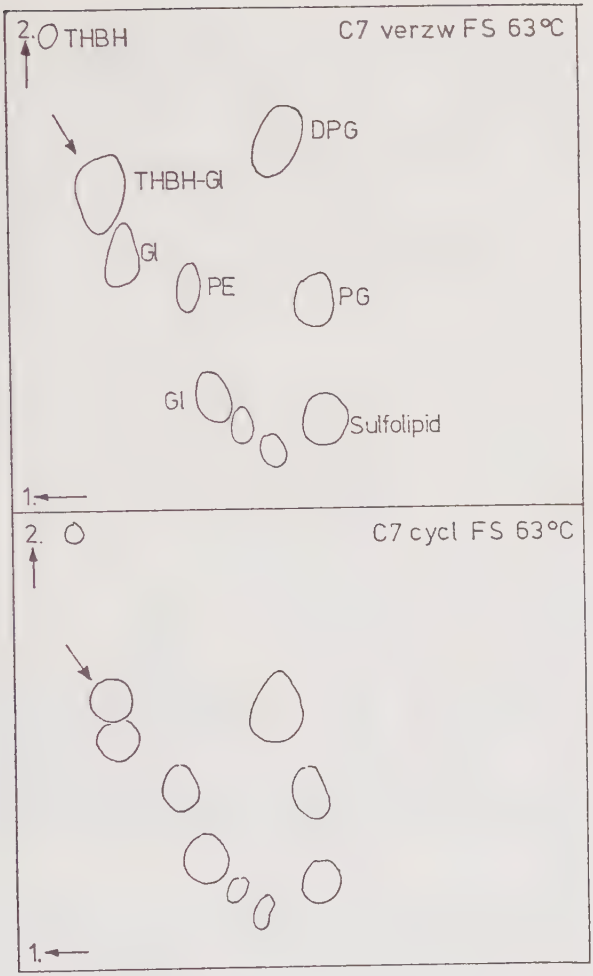


Abb. 27: Zweidimensionale Dünnschichtchromatogramme der Lipide von C 7 in Abhängigkeit des FS-Musters, 63°C, pH 4.

analysen vom Wildtyp und den Mutanten bei verschiedenen Umweltbedingungen wieder (Fermenterkulturen).
Auffällig ist die nahezu in allen Fällen vorhandene Abhängigkeit des Hopangehaltes von den Kulturbedingungen.
Die Zellen wurden spätestens in der Mitte der logarithmischen Phase geerntet; damit dürfte die Sauerstoff- und

Nährstoffversorgung bei allen Ansätzen die gleiche gewesen sein, und die Zellen wuchsen somit also unter identischen Bedingungen. Der Hopanoidgehalt nimmt einerseits bei den Mutanten und beim Wildtyp mit Temperatur und Protonenkonzentration zu, andererseits weisen die Mutanten mit verzweigten FS bei gleichen Kulturbedingungen einen wesentlich höheren Hopanoidgehalt auf (bezogen auf Lipide und Trockengewicht) als die Zellen mit cyclischen FS sowie der Wildtyp. Der Unterschied ist bei allen pH- und Temperaturbedingungen zu beobachten. Die Daten vermitteln den Eindruck, daß bei normalen und besonders bei extremen Umweltbedingungen das Fehlen der cyclischen FS durch einen erhöhten Gehalt an Hopanen ausgeglichen wird. Dieser Ersatz von FS durch Hopane ist besonders interessant im Zusammenhang mit der von KANNENBERG (1983) und KANNENBERG et al. (1984, 1986) beschriebenen, oberhalb des Phasenüberganges kondensierenden Wirkung dieser beiden Membrankomponenten.
Ferner ist aus den Tabellen zu entnehmen, daß die Zellen mit verzweigten FS ca. 10% weniger Lipide, bezogen auf das Trockengewicht enthalten. Dadurch ergibt sich eine geringere Menge an FS, die jedoch auch durch das vermehrte Auftreten der Hopane vermindert werden. Eine Ursache für die geringere Menge verzweigter FS könnte zumindest teilweise der höhere molekulare Flächenbedarf dieser FS sein; auch ein verändertes Protein-Lipid-Verhältnis kann nicht ausgeschlossen werden.
Durch Füttern von verzweigten Aminosäuren wurde versucht im Wildtyp ein FS-Muster zu erzeugen, das mit verzweigten FS angereichert ist. Der Einbau war, trotz der doppelten, der bei den Mutanten verwendeten Fütterungskonzentration, mäßig. Es lagen in der logarithmischen Wachstumsphase nur 18% gegenüber 10% der Kontrollkultur ohne Aminosäuren an verzweigten FS vor; eine deutliche Auswirkung auf die Hopanoidmenge konnte nicht festgestellt werden: der aminosäuregefütterte Wildtyp hatte etwas weniger Hopane.
Der Gehalt an freiem Hopen, der über die Gaschromatogramme bei der Hopanoidanalyse ebenfalls zugänglich ist (Abb. 29), war keinen wesentlichen Schwankungen in Abhängigkeit des

Tab. 5: Hopanoid- und FS-Gehalt der cyclohexanfettsäureauxotrophen Mutanten bei unterschiedlichen Umweltbedingungen, Sporulationsmedium.

Kultur	FS OD	TG (g)	Lipid (mg)	Lipid (mg/gTG)	Hopanoide (mg/25mg Lipid)	Hopanoide (mg/g TG)	Fettsäuren Ch-FS %	verzw. FS %	(mg/25mg Lipid)	(mg/g TG)
M 13 50°C	Ch 1,2	2,7	126,5	46,6	2,2	4,2	76	22		
(pH 4)	verzw.1,0	2,5	97,0	39,0	4,3	6,8	15	76		
65°C	Ch 1,4	3,4	173,0	50,9	6,5	11,6	67	33		
	verzw.1,6	4,2	188,0	44,7	9,8	19,9	5	95		
C 7 53°C	Ch 1,5	4,3	240,3	55,9	1,7	3,8	47	52	8,5	19
(pH 4)	verzw.1,15	3,8	192,5	50,7	3,3	6,7	2	98	(17/12 i/aiC17) 8,5	17
63°C	Ch 1,5	4,4	177,3	40,3	4,2	6,7	63	37	10,7	17
	verzw.2,0	5,5	198,4	36,0	7,2	10,3	0,5	99	(44/17 i/aiC17) 8,2	12
C 8 50°C	Ch 1,25	3,4	194,0	57,0	3,1	6,9	94	3	9,9	23
(pH 4)	verzw.1,05	2,5	118,0	47,2	3,5	6,5	6	93	7,9	15
C 10 53°C	Ch 2,0	5,7	276,0	48,4	2,7	5,1	96	3	9,5	18
(pH 4)	verzw.0,7	1,5	74,0	49,3	4,9	9,7	4	91	8,5	17
C 10 53°C										
pH 2,55	Ch 1,3	4,3	183,0	42,6	2,4	4,1	97	3	12	21
pH 2,75	verzw.0,7	2,3	90,0	39,1	6,3	10,0	14*	81	11	17
C 7 53°C										
pH 2,45	Ch 1,2	4,9	225,0	46,4	3,0	5,5	52	45	16	30
pH 2,45	verzw.1,25	5,1	215,0	42,4	4,4	7,5	1	97	14	25

* Vorkultur wurde mit 0,05mM Cyclohexancarbonsäure gefüttert.

Tab. 6: Hopanoid- und FS-Gehalt vom Wildtyp bei unterschiedlichen Umweltbedingungen, Sporulationsmedium.

Kultur	OD	TG (g)	Lipid (mg)	Lipid (mg/g TG)	Hopanoide (mg/25mg Lipid)	Hopanoide (mg/g TG)	Fettsäuren Ch-FS %	Fettsäuren verzw.FS %	Fettsäuren (mg/25mg Lipid)	Fettsäuren (mg/g TG)
Chc gefüttert	1,8	0.9	43,8	49,3	2,97	5,9	88	10	11	21
verzw. AS gef.	2,0	1,0	49,3	49,8	2,64	5,3	82	18	12	23
(Kolbenkulturen, 53°C, pH 4)										
50°C, pH 4	1,85	5,6	339,0	61,0	1,12	2,7	81	15	14	34
63°C pH 4	2,0	5,8	295,0	51,3	3,12	6,4	96	4	14	28

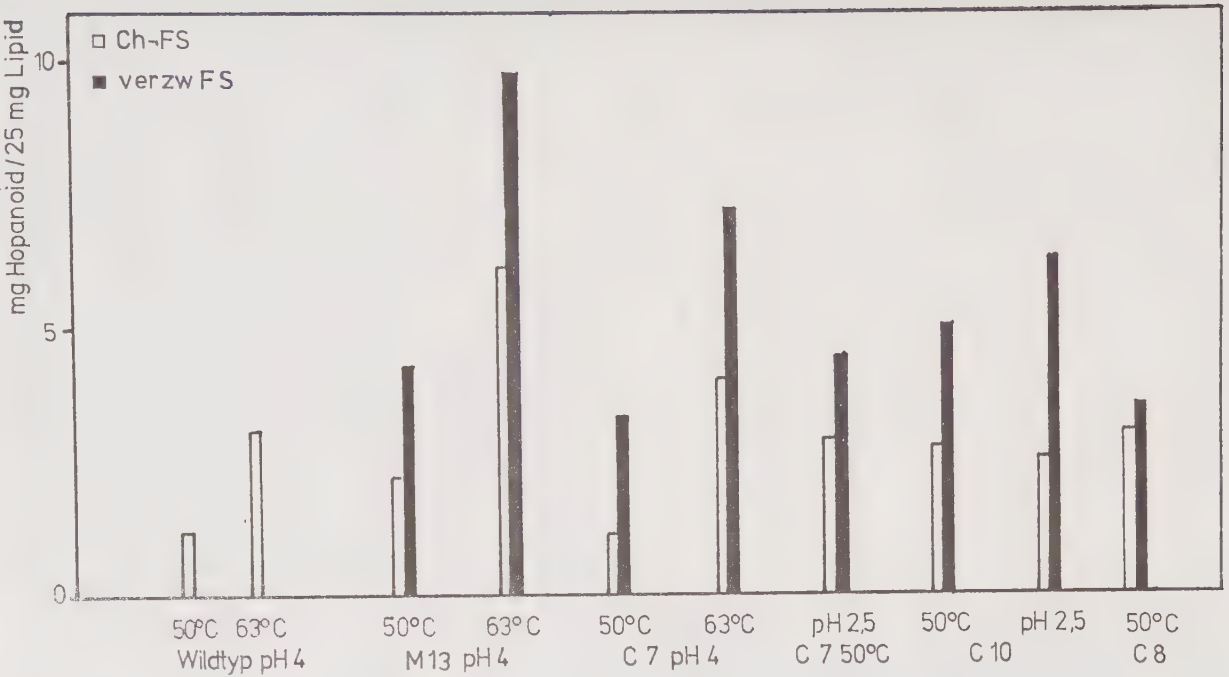


Abb. 28: Hopanoidgehalt vom Wildtyp und den Mutanten M 13, C 7, C 8 und C 10 bei unterschiedlichem FS-Muster sowie verschiedenen Temperatur- und pH-Bedingungen. Siehe Tab. 5 und Tab. 6.

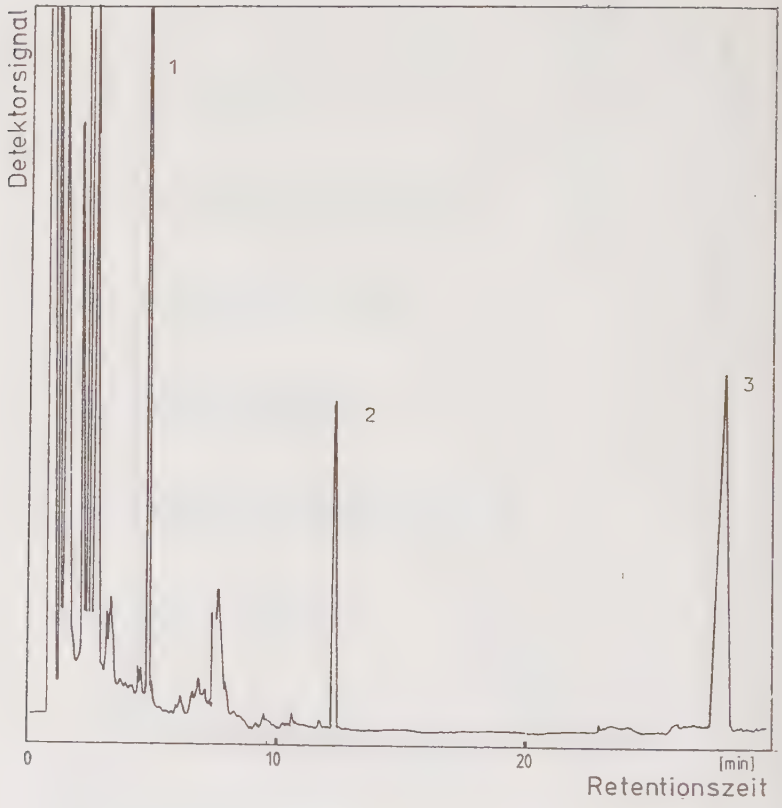


Abb. 29: Gaschromatogramm der Hopanoide aus Lipiden von C 7, 53°C, pH 4, verzweigte FS.
1 - interner Standard
2 - Hopen
3 - 1-Hydroxyethan-29-hopanacetat (derivatisiertes THBH und THBH-Gl).

FS-Musters und der Umweltbedingungen unterworfen (in den Tabellen nicht dargestellt).
Der FS-Gehalt, der für die Hopanbestimmung verwendeten Lipide ist in den Tabellen 5 und 6 ebenfalls wiedergegeben. Die Kulturen mit cyclischen FS und der Wildtyp haben einen mit steigender Temperatur zunehmenden Anteil cyclischer FS; bei C 7 ist eine Zunahme der iso-C-17-FS mit der Tem-

peratur zu beobachten.

3.5.7. Physikochemische Untersuchungen

3.5.7.1. Dichtemessungen

Physikochemische Messungen an Lipiden werden in den meisten Fällen an reinen Lipiden oder an zumindest genau definierbaren Lipidgemischen in Form von Liposomen, Monolayern und Black-Lipid-Membranen durchgeführt. Hierfür sind eine Reihe von Methoden entwickelt und eingesetzt worden (Übersichten in CHAPMAN & HAYWARD 1985, MC ELHANEY 1984, SEELIG & SEELIG 1980, STUBBS 1983).
Gesamtlipidextrakte von Mikroorganismen sind in ihrer Zusammensetzung schlecht definiert, das Molekulargewicht ist nicht bekannt, und es sind nur wenige Methoden geeignet, solche heterogenen Gemische zu charakterisieren.
Für die Lipidextrakte aus den Mutanten wurde als Untersuchungsmethode die Dichtemessung und die Differentialkalorimetrie gewählt.
Bei der Dichtemessung, die für Untersuchungen an Proteinen entwickelt wurde (KRATKY et al. 1970), werden die volumetrischen Daten in Abhängigkeit der Temperatur gemessen. Die Messungen geben Aufschluß über Phasenumwandlungen. Es läßt sich bei bekanntem Flächenbedarf aus Monolayermessungen die Dicke von Bilayermembranen ermitteln. Die Methode schien geeignet, das spezifische Volumen (Kehrwert der Dichte) der Lipide von Mutanten und Wildtyp in einem gewissen Temperaturbereich vergleichend zu erfassen. Auf Meßwerte von anderen Organismen kann nicht zurückgegriffen werden, da mit mikrobiellen Gesamtlipiden offenbar noch keine Dichtemessungen durchgeführt wurden. Abb. 30 gibt die spezifischen Voluminakurven des Wildtyps und der Mutante C 7 bei unterschiedlichen Temperaturen und FS-Mustern wieder. In Tab. 7 sind die aus den Kurven ermittelten thermischen Volumenausdehnungskoeffizienten im Temperaturbereich zwischen 50 und 60°C aufgelistet.
Das spezifische Volumen der Wildtyplipide ist bei 65°C Wachstumstemperatur kleiner als bei 50°C. Der Ausdehnungs-

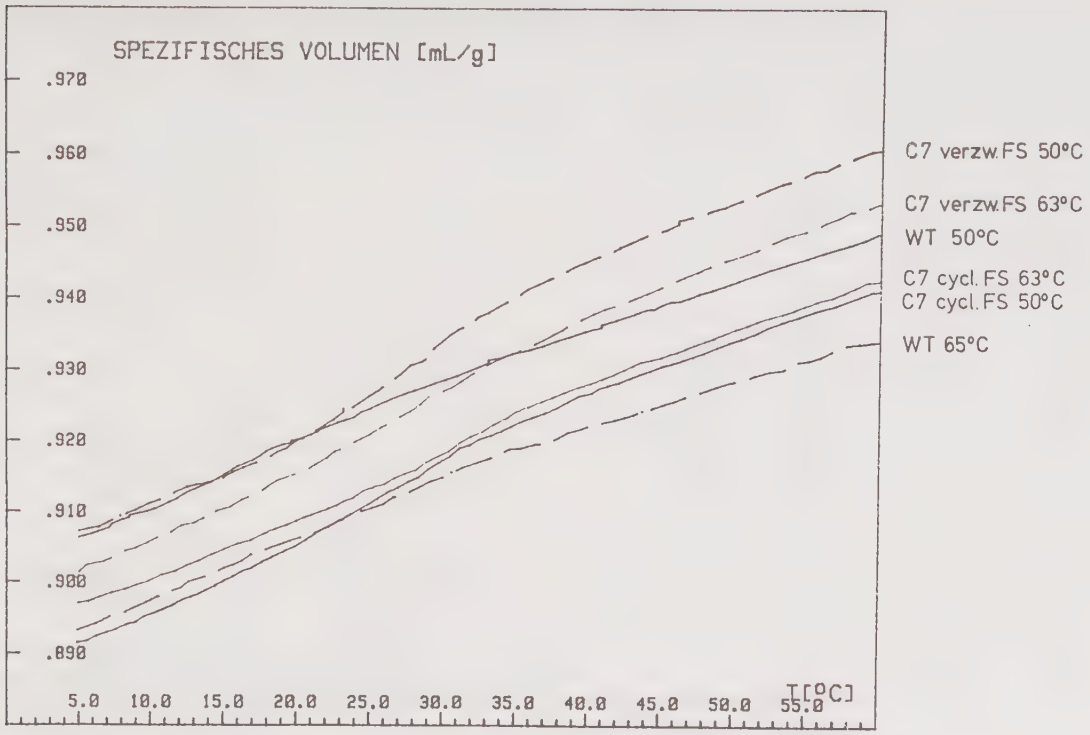


Abb. 30: Spezifische Voluminakurven der Gesamtlipide der bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen gewachsenen Zellen der Mutante C 7 und des Wildtyps. Vergl. Tab. 5 und Tab. 6.

koeffizient ist von den Lipiden der bei 65°C gewachsenen Zellen kleiner als von den Lipiden der 50°C-Zellen. Die Packungsdichte der Membran der bei hohen Temperaturen gewachsenen Organismen ist also größer, ihre temperaturabhängige räumliche Ausdehnung kleiner. Dies könnte eine Folge des höheren Hopangehaltes bei den hohen Wachstumstemperaturen sein. Durch die kondensierende Wirkung der Hopane wird das Membraninnere verdichtet.
Von den Mutantenlipiden von 50°C Wachstumstemperatur haben die cyclohexanfettsäurehaltigen Lipide ein wesentlich kleineres spezifisches Volumen als die Lipide mit verzweigten FS. Auch der Ausdehnungskoeffizient ist bei ersteren deutlich kleiner.
Das gleiche Bild ergibt sich bei den 63°C-Lipiden von C 7. Die Lipide mit cyclischen FS weisen praktisch die gleichen Werte auf, wie die bei 50°C Wachstumstemperatur, während die Lipide mit verzweigten FS ein höheres spezifisches Volumen und einen größeren Volumenausdehnungskoeffizienten haben als die ersteren.
Bei den Mutantenlipiden werden die volumetrischen Eigenschaften demnach von den FS-Mustern bestimmt. Lipide mit cyclischen FS sind dichter gepackt und haben eine geringere thermische Ausdehnung als Lipide mit verzweigten FS bei niederen und hohen Wachstumstemperaturen. Der sich mit dem FS-Muster und der Temperatur ändernde Hopangehalt spielt angesichts der gravierenden Unterschiede in der FS-Zusammensetzung der Lipide nur eine untergeordnete Rolle bezüglich der volumetrischen Daten. Er könnte in der größeren Dichte der Lipide mit verzweigten FS bei 63°C Wachstumstemperatur gegenüber der der verzweigtkettigen 50°C-Lipide zum Ausdruck kommen.
Die Werte von den reinen Lipiden (Tab. 8) zeigen gute Übereinstimmung mit den eigenen Messungen (Tab. 7), insbesondere, wenn man im Falle der Lipide mit Cyclohexanfettsäuren die kondensierende Wirkung der Hopane in Betracht zieht.
Die erhöhten Werte der Lipide mit verzweigten FS zeigen sich auch bei den reinen Lipiden mit iso- oder anteiso-FS.
Phasenübergänge, die sich in Knicken der spezifischen

Tab. 7: Volumenausdehnungskoeffizienten der Lipide von C 7 und des Wildtyps im Temperaturintervall 50 - 60°C.

WT	50°C	7,29 x 10^{-4}/°C	
WT	65°C	7.06	"
C 7 Ch-FS	50°C	7,76	"
C 7 verzw.FS	50°C	8,80	"
C 7 Ch-FS	63°C	7,69	"
C 7 verzw.FS	63°C	9,02	"

Tab. 8: Volumenausdehnungskoeffizienten reiner Lipide oberhalb des Phasenüberganges (BLUME, pers. Mitteilung).

Dipalmitoyl-PC	10,10 x 10^{-4}/°C	
Ch-C 17-PC	8,64	"
Ch-C 18-PC	9,10	"
Ch-C 19-PC	7,77	"
Ch-C 20-PC	9,26	"
iso-C 17-PC	12,00	"
anteiso-C 17-PC	9,90	"
Ch-C 17-PC/50% Cholesterol	7,20	"

Voluminakurven äußern, sind besonders ausgeprägt bei den Mutantenlipiden mit verzweigten FS. Die Phasenübergänge sind bei 35°C in allen Fällen abgeschlossen.

3.5.7.2. Differentialkalorimetrie

Die Kalorimetrie erlaubt die energetische Erfassung von Lipidphasenumwandlungen über Messung der zusätzlich für solche Prozesse benötigten Wärmemenge. Auch diese Methode kann bei Gesamtlipiden angewendet werden und gibt Aufschlüsse über den Temperaturbereich des allerdings breiten Phasenüberganges der Gemische.
In Abb. 31 sind die Phasenübergänge der Wildtyp- und Mutentenlipide im Temperaturintervall zwischen 5 und 50°C dargestellt. Da es sich hier um Lipidgemische und keine reinen Lipide handelt, erfolgt der Phasenübergang nicht bei einer definierten Temperatur, sondern in einem breiten Temperatur-

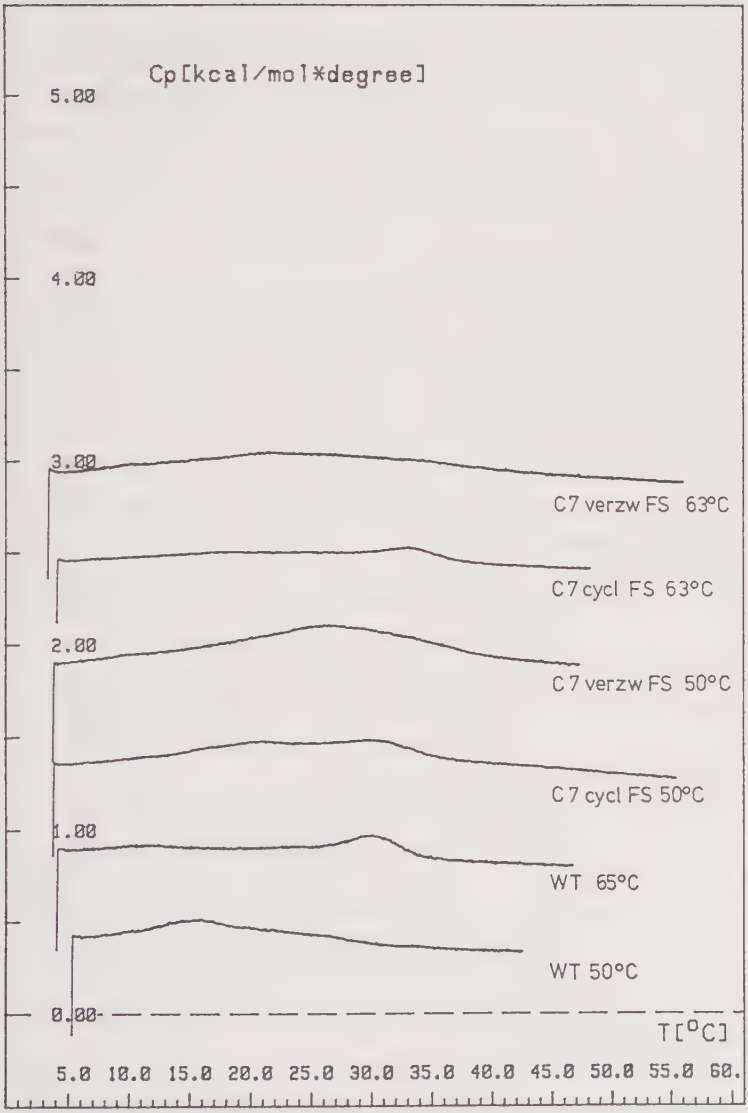


Abb. 31: Kalorigramme der Gesamtlipide der bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen gewachsenen Zellen der Mutante C 7 und des Wildtyps. Vergl. Tab. 5 und Tab.6.

bereich gemäß den Einzelübergängen der verschiedenen Komponenten. Die Eigenschaft der Hopanoide, den Phasenübergang zu löschen, trägt ebenfalls zur geringen Ausprägung der Phasenumwandlung bei. Die unteren beiden Kalorimeterkurven geben das Phasenverhalten der Wildtyplipide wieder. Die Hauptkomponente der Phasenumwandlung ist bei den Lipiden von 50°C Wachstumstemperatur etwa bei 15°C, die der 65°C-Lipide bei 30°C. Dies vermittelt den Eindruck, daß beim Wildtyp der Phasenübergang synchron mit der Wachstumstemperatur verschoben wird.

Unübersichtlicher ist das Übergangsverhalten der Mutantenlipide. Speziell bei den Lipiden mit verzweigten Aminosäuren ist die Umwandlung sehr schlecht zu erkennen. Dies dürfte eine Folge der größeren Anzahl der sich im FS-Teil unterscheidenden Lipidsorten sein, da allein 6 unterschiedliche Fettsäuren in vergleichbaren Mengen vorliegen. Im Falle der Lipide mit cyclischen FS, hier existieren nur zwei FS-Hauptkomponenten, nämlich Ch-C-17- und Ch-C-19-FS, ist die Phasenumwandlung etwas deutlicher zu erkennen. Der größte Teil der Umwandlung findet bei den 50°C-Lipiden bei etwa 30°C statt, bei den 63°C-Lipiden bei etwa 35°C. Hier ist demnach keine ausgeprägte Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur festzustellen. Bei den verzweigtkettigen Lipiden läuft der größte Teil des Überganges zwischen 20 und 30°C ab, eine wachstumstemperaturbedingte Verschiebung ist gleichfalls nicht zu registrieren.

Nach den obigen Daten sind die Phasenübergänge der gemessenen Lipide bei physiologischen Temperaturen abgeschlossen. Sämtliche Umwandlungen liegen im Bereich zwischen 15 und 35°C, wobei die Mutantenlipide mit verzweigten FS eher etwas niederere Umwandlungstemperaturen aufweisen als die Lipide der bei gleichen Bedingungen gewachsenen Zellen mit cyclischen FS.

Die unterschiedliche Intensität der Phasenübergänge gleicher Lipide bei den beiden verwendeten Meßmethoden beruht auf der Erfassung verschiedener Meßgrößen. Phasenumwandlungen werden im Kalorigramm gut sichtbar, wenn eine hohe Übergangsenthalpie in einem engen Temperaturintervall auf-

tritt, was im vorliegenden Fall am ehesten für die Lipide mit cyclischen FS zutrifft, die im wesentlichen nur aus zwei FS-Komponenten bestehen. Bei den Dichtemessungen werden Volumenänderungen registriert, die demnach am größten bei den Lipiden mit verzweigten FS sind, was auch die entsprechenen Ausdehnungskoeffizienten bereits nahelegen.

3.5.8. Versuche mit membranaktiven Agenzien

3.5.8.1. Alkohole

Alkohole sind chaotrope Agenzien, in deren Gegenwart eine Vielzahl von Membran- und Zellfunktionen beeinträchtigt werden. Alkohol in der Umwelt von Mikroorganismen wird als eine Form von Streß gedeutet, analog hohen Protonenkonzentrationen und Temperaturen (INGRAM 1976, SULLIVAN et al. 1979, ZEMLYANUKHINA et al. 1981). Mit den folgenden Versuchen sollte festgestellt werden, welchen Einfluß Alkohole auf B. acidocaldarius und die Mutanten mit unterschiedlichen FS-Mustern ausüben.
Der Wildtyp wird ab Konzentrationen von 7% bei 50°C und etwa 5% bei 60°C im Wachstum gehemmt. Tab. 9 zeigt die Analyse des Hopangehaltes und der Fettsäuren von Kolbenkulturen bei 55°C und pH 4.

Tab. 9: Hopanoid- und FS-Gehalt der Wildtyplipide bei verschiedenen Ethanolkonzentrationen, MM, 55°C, pH 4.

Ethanol %	OD	Hopanoide (mg/25mg Lipid)	Hopanoide (mg/g TG)	cycl. FS % C 17/C 19	verzw. FS %
0	1,7	3,4	6,4	55 / 26	20
2	1,6	3,7	7,5	45 / 29	25
5	1,4	5,4	11,7	46 / 34	19

Aus den Daten in Tab. 9 ist ersichtlich, daß das Vorhandensein von Ethanol einen erhöhten Hopangehalt bei sonst unveränderten Umweltbedingungen bewirkt. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Zymomonas mobilis (BRINGER et al. 1984). Auf dem FS-Sektor sind keine drastischen Unterschiede festzustellen, das Verhältnis innerhalb

der Cyclohexanfettsäuren wird zu einem höheren Anteil der längerkettigen Ch-C-19-FS bei steigenden Ethanolkonzentrationen verschoben.
Insgesamt sind die ethanolbedingten Änderungen im Lipidmuster einer Adaptation an höhere Umgebungstemperaturen zu vergleichen.
Abb. 32 beschreibt das Verhalten der Mutante C 7 bei verschiedenen Ethanolkonzentrationen und pH-Werten bei 53°C im Biophotometer. Die Mutante mit cyclischen FS kann wesentlich höhere Ethanolmengen ertragen als mit verzweigten FS.
Versuche mit höheren Temperaturen erwiesen sich als nicht reproduzierbar, vermutlich entwickelt Ethanol bei Temperaturen über 60°C bereits einen hohen Dampfdruck und verdunstet leicht. Mit Propanol wurde mit C 7 bei 50°C, pH 4 für die cyclohexancarbonsäuregefütterte Kultur eine Hemmschwelle von 3%, für die Kultur mit verzweigten FS eine von 2% ermittelt.
Durch Zugabe der doppelten Menge verzweigter Aminosäuren konnte bei C 7 mit verzweigten FS eine Anhebung der Ethanoltoleranz auf 3% bei 53°C und pH 4 im Biophotometer erreicht werden. Dies könnte bedeuten, daß Ethanol die Aufnahme der verzweigten Aminosäuren behindert. In der Literatur sind verschiedene Fälle von Transportinhibitionen durch Ethanol bei Mikroorganismen beschrieben worden (INGRAM 1984, LEAO & VAN UDEN 1985).

3.5.8.2. Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP)

Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon ist ein Hemmstoff der Atmungskette sowie der Photosynthese, der Protonen durch die normalerweise für Ionen undurchlässige Zellmembran ins Zellinnere zurückfließen läßt, also den Aufbau des für die Energiegewinnung notwendigen Protonengradienten verhindert. Das Ausmaß des CCCP-induzierten Protonenrückflusses über die Membran könnte eventuell von der Lipidphase und damit vom FS-Muster abhängig sein. Die Hemmschwelle beim Wildtyp (totale Wachstumshemmung) wurde mit 5 µM bei 58°C, pH 4,2 auf Minimalmedium im Biophotometer ermittelt.

Bei den Mutanten mit cyclischen FS lag die Hemmschwelle wie beim Wildtyp unter den gleichen Bedingungen ebenfalls bei 5 µM. Die Mutante C 2 mit verzweigten FS erwies sich als empfindlicher gegenüber CCCP.

Bei pH 4, 58°C wurde eine Hemmschwelle von 3 µM beobachtet, bei einem pH-Wert von 2,8 sank die Hemmschwelle auf 2 µM, die der Zellen mit cyclischen FS lag bei diesem pH-Wert bei 4 µM.

3.5.8.3. Detergenzien

Detergenzien schädigen Zellen, indem sie sich durch ihren amphiphilen Charakter in die Zellmembran einlagern und deren Integrität zerstören (SCHLEGEL 1985). Die Empfindlichkeit gegenüber Detergenzien könnte ein Maß für die Membranstabilität darstellen.
Eingesetzt wurden Natriumdodecylsulfat (SDS) und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB).
Der Wildtyp wurde im Biophotometer bei 53°C, pH 4 in Mini-

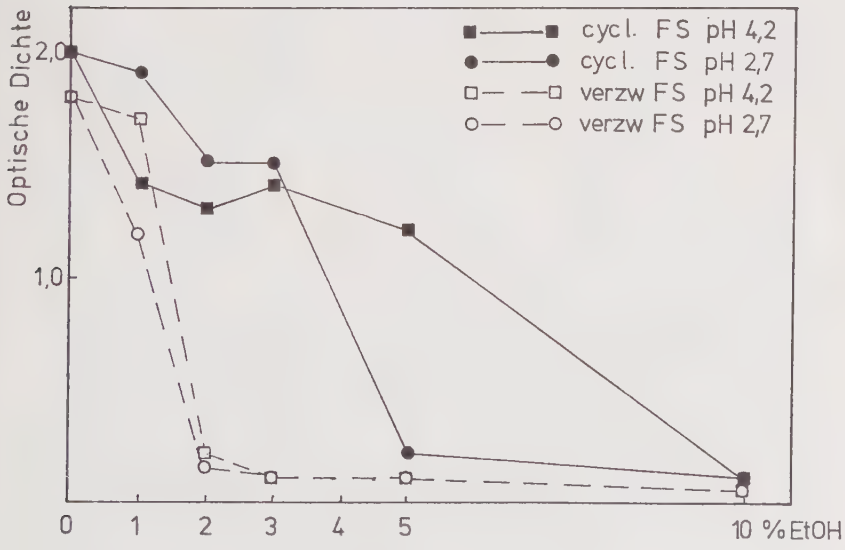


Abb. 32: Wachstum von C 7 bei 53°C und verschiedenen pH-Werten in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration und des FS-Musters.

malmedium von SDS bei 10 µM, von CTAB bei 5 µM im Wachstum gehemmt.
Die Mutanten C 2 und C 7 mit cyclischen bzw. verzweigten FS zeigten bei SDS die gleiche Hemmschwelle wie der Wildtyp, bei CTAB Hemmung ab 3 µM, jedoch keine Unterschiede hinsichtlich des FS-Musters.

3.5.9. Temperaturschockversuche

Bei vielen Organismen wurde die Empfindlichkeit gegenüber plötzlicher Kälte oder Hitze nachgewiesen (Übersicht in MC ELHANEY 1984). Es konnte gezeigt werden, daß der Grad der Empfindlichkeit gegen Erhitzen oder Abkühlen auf eine bestimmte Temperatur von der Wachstumstemperatur abhängt. Da die FS-Zusammensetzung der Membran im Gegensatz zu vielen anderen Zellkomponenten drastischen Änderungen bei sich ändernden Umgebungstemperaturen unterworfen ist, könnte sie eine wichtige Rolle spielen bei der Sensibilität gegenüber plötzlicher Hitze oder Kälte.
Die folgenden Versuche befassen sich mit der Hitze- und Kältetoleranz der Mutante C 2 mit unterschiedlichen FS-Mustern. Durchgeführt wurden sie im Biophotometer in Minimalmedium bei pH 4.
Abb. 33 zeigt das Verhalten der wachsenden Zellen bei Abkühlung innerhalb von 10 sec auf 0°C für verschieden lange Zeiten und anschließendes Weiterinkubieren bei 53°C.
Es ist bei keiner der Kulturen eine lag-Phase nach dem Kälteschock zu beobachten, was nicht auf eine nennenswerte Abtötung der Zellen schließen läßt. Ein Kälteschock wird also unabhängig vom FS-Muster gut überstanden.
Die Hitzeresistenz wurde getestet, indem abgekühlte, logarithmische Kulturen bei 72°C ins Biophotometer eingesetzt und dort unterschiedliche Zeiten belassen wurden, bei erhöhter Schüttelfrequenz ohne Messung der optischen Dichte.

Hier ergaben sich für die Kulturen mit verzweigten FS etwas längere lag-Phasen für das Weiterwachsen bei 53°C nach der Hitzebehandlung gegenüber den cyclohexancarbonsäuregefütterten Kulturen (Abb. 34).
Der Versuch wurde dahingehend abgewandelt, daß die Kulturen

mehrere Male für 20 min bei 72°C inkubiert wurden mit zwischenzeitlichem Abkühlen in Eiswasser.
Bei diesem Experiment wuchsen nach der Temperaturbehandlung nur noch die Zellen mit cyclischen FS weiter, z.T. nach längerer lag-Phase, während bei der Mutante mit verzweigten FS nur noch die Kontrollkultur wachsen konnte, die während der Temperaturbehandlung im Eiswasser stand (Abb. 35).
Während und nach dem Versuch (direkt danach und 6 Stunden später), wurde eine Lebendzellzahlbestimmung durchgeführt, deren Ergebnis in Abb. 36 dargestellt wird. Die Lebendzellzahl der Mutanten mit verzweigten FS hat nach der Temperaturbehandlung wesentlich stärker abgenommen als die der Mutante mit dem natürlichen FS-Muster.
Insgesamtgesehen sind die Mutanten mit verzweigten FS empfindlicher gegenüber plötzlicher Hitzeeinwirkung.

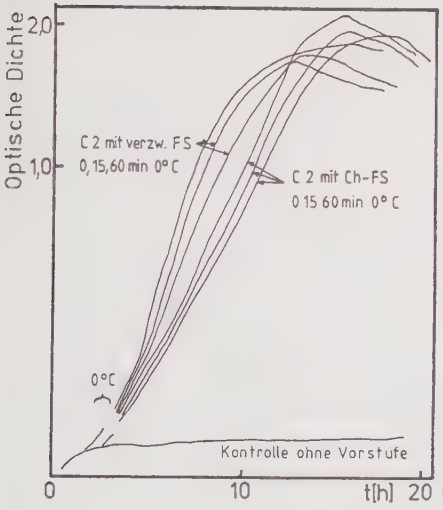


Abb. 33: Wachstum von C 2 nach Kälteschock (0, 15, 60 min, 0°C) bei 53°C, pH 4, MM.

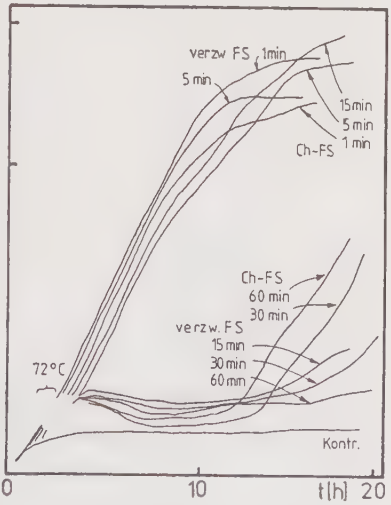


Abb. 34: Wachstum von C 2 nach Hitzeschock (1, 5, 15, 30, 60 min, 72°C) bei 53°C, pH 4, MM.

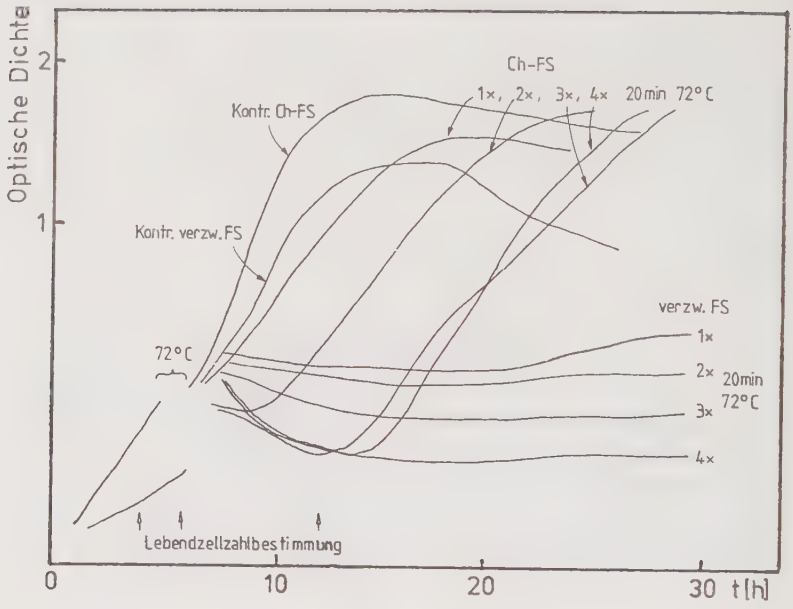


Abb. 35: Wachstum von C 2 nach 1- bis 4-maligem Hitzeschock (jeweils 20 min bei 72°C) bei 53°C, pH 4, MM.

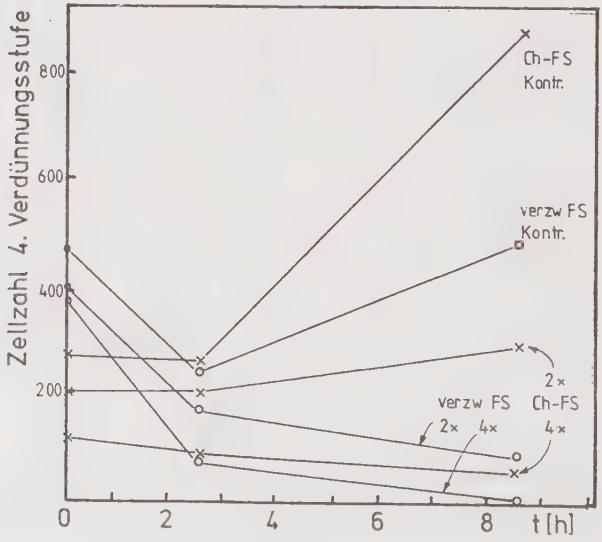


Abb. 36: Lebendzellzahlbestimmung während des Temperaturschockversuchs in Abb. 35.

3.5.10. Transportmessungen

Aktiver Transport ist eine wichtige Funktion von Biomembranen. In vielen Versuchen wurde an Pro- und Eukaryonten gezeigt, daß die physikalische Beschaffenheit der Lipide einen wesentlichen Einfluß auf das optimale Funktionieren der Membranproteine ausübt (MC ELHANEY 1982, SANDERMANN 1978, SPECTOR & YOREK 1985). Besonders intensiv untersucht sind ATPasen und Adenylatcyclasen bei Eukaryonten (STUBBS 1983, MARCUS et al. 1986). Viele Erkenntnisse wurden auch an Mikroorganismen gewonnen (CRONAN & GELMANN 1975, BALDASSARE et al. 1977, MC ELHANEY 1982). Hier waren es vor allem Experimente mit E. coli und Mycoplasmen, die Unterschiede in der Funktion von Transportsystemen mit der physikalischen Beschaffenheit der Membranlipide in Verbindung brachten. Mit den folgenden Versuchen wurden die Auswirkungen unterschiedlicher FS-Muster auf Transportsysteme von B. acidocaldarius untersucht.

3.5.10. 1. Lysintransport

Für die Aufnahme der Aminosäuretransportraten wurden die MM-Kulturen ohne vorheriges Waschen verwendet; damit konnte das Abkühlen der Kulturen beim Zentrifugieren und Waschen sowie das Aufnehmen in frischem Medium vermieden werden.
Zuvor mußte jedoch sichergestellt werden, daß die im Medium vorhandenen FS-Vorstufen den zu messenden Aminosäuretransport nicht beeinflussen, d.h. mit dem gleichen Transportsystem aufgenommen werden. Die Lysinaufnahme wurde beim Wildtyp und der Mutante C 2 mit cyclischen FS mit und ohne verzweigte Aminosäuren im Medium bei Lysinkonzentrationen von 0,5, 2, 20 µM gemessen. Die verzweigten Aminosäuren wurden 30 min vor der Messung in der üblichen Fütterungskonzentration zugegeben, die Bedingungen waren 50°C, pH 4.

Die Meßwerte ließen keinerlei Interferenz zwischen Lysintransport und den verzweigten Aminosäuren erkennen, bei den entsprechenden Konzentrationen ergaben sich mit und ohne FS-Vorstufen die gleichen Transportraten, so daß auf getrennte Aufnahmesysteme geschlossen werden kann.

Abb. 37 zeigt den Lysintransport beim Wildtyp bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen sowie die entsprechende Lineweaver-Burk-Darstellung, Tab. 10 die K_t-Werte bei verschiedenen pH- und Temperaturbedingungen.

Tab. 10: K_t-Werte des Lysintransports beim Wildtyp unter verschiedenen Umweltbedingungen.

50°C	pH 4,2	K_t	1,6/12 µM
	pH 2,6		1,5/12
63°C	pH 4,2		1,5/10
	pH 2,6		1,5/10

Das Lineweaver-Burk-Diagramm zeigt einen zweiphasigen Kurvenverlauf. Dies deutet darauf hin, daß für die Lysinaufnahme zwei Transportsysteme existieren, die sich in der Affinität für das Substrat unterscheiden.
Die Transportkonstanten (Tab. 10) wiesen keine wesentlichen Unterschiede in Abhängigkeit von pH und Temperatur auf.
In Abb. 38 und 39 ist die Aufnahmekinetik für Lysin bei der Mutante C 2 mit cyclischen und verzweigten FS bei 50°C, pH 4,2 und 61°C, pH 2,6 dargestellt. Tab. 11 gibt die ermittelten K_t-Werte wieder.
Während die Meßwerte bei den gemäßigten Umweltbedingungen 50°C, pH 4,2 in etwa die Verhältnisse beim Wildtyp widerspiegeln, hat sich die Transportrate bei hohen Temperaturen und niederen pH-Werten bei der Mutante mit verzweigten FS verschlechtert. Da ihr Lineweaver-Burk-Plot bei diesen Bedingungen einphasig ist, dürfte das Transportsystem mit der hohen Substrataffinität nicht mehr funktionieren.
Wie aus den Tabellenwerten (Tab. 11) ersichtlich ist, verschlechtert sich die Lysinaufnahme bereits bei 61°C, pH 4,2 und bei 50°C, pH 2,6; die K_t-Werte der Mutante mit cyclischen FS sind bei allen Bedingungen den beim Wildtyp ermittelten Werten ähnlich.
Die Lysinaufnahme konnte durch Zugabe von CCCP (20 µM), das den pH-Gradienten über der Membran zerstört, gehemmt werden, während der ATPase-Hemmstoff DCCD keine Wirkung auf den Transport ausübte. Die Lysinaufnahme wird also über

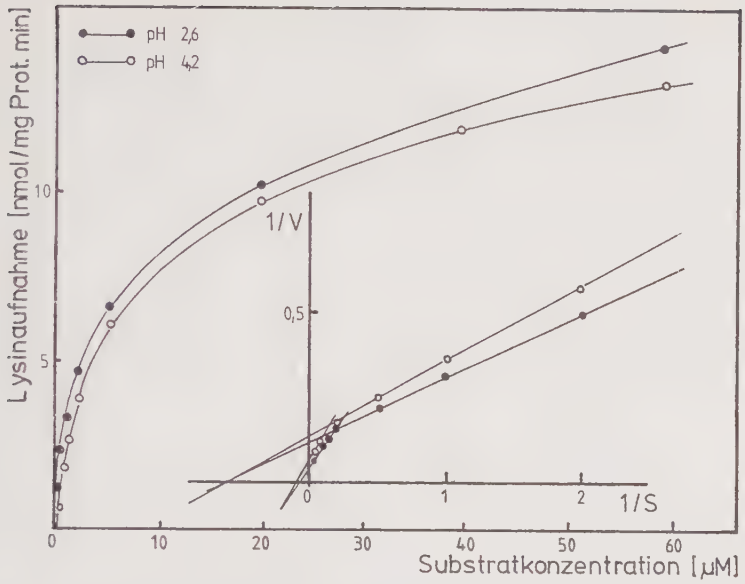


Abb. 37: Lysinaufnahme beim Wildtyp (65°C, verschiedene pH-Werte) bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Reziproke Darstellung der Kinetik.

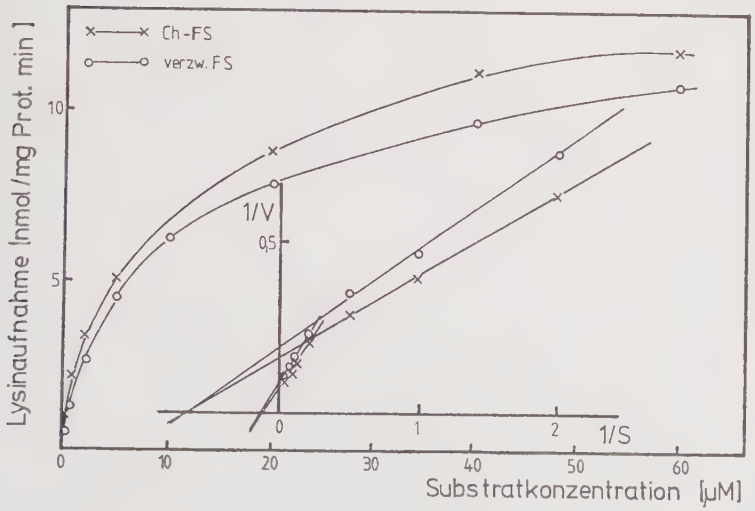


Abb. 38: Lysinaufnahme von C 2 (50°C, pH 4,2) bei verschiedenen Substratkonzentrationen in Abhängigkeit des FS-Musters. Reziproke Darstellung der Kinetik.

den Protonengradienten energetisiert.

Tab 11: K_t-Werte des Lysintransports bei der Mutante C 2 unter verschiedenen Umweltbedingungen und FS-Mustern.

Cycl. FS	50°C	pH 4,2	K_t	1,5/10 µM
verzw. FS				1,5/7,6
cycl. FS		pH 2,6		1,4/14
verzw. FS				2,6/14
cycl. FS	61°C	pH 4,2		2,4/14
verzw. FS				3,3/14
cycl. FS		pH 2,6		1,4/7,1
verzw. FS				- /6,3

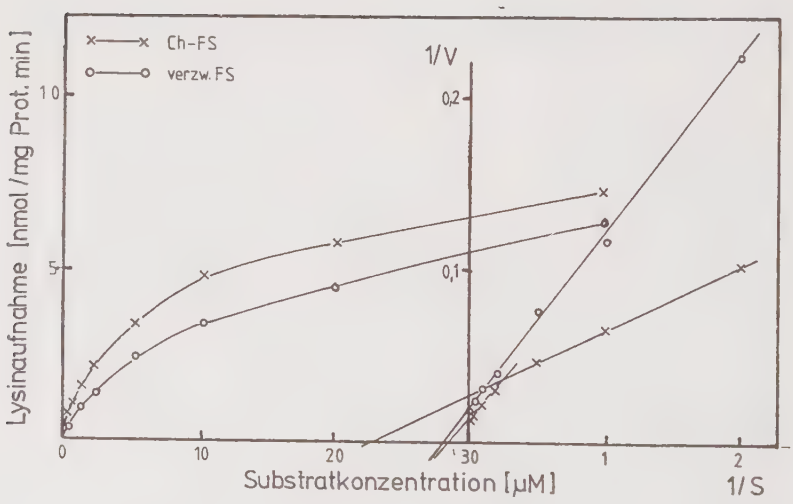


Abb. 39: Lysinaufnahme von C 2 (61°C, pH 2,6) bei verschiedenen Substratkonzentrationen in Abhängigkeit des FS-Musters. Reziproke Darstellung der Kinetik.

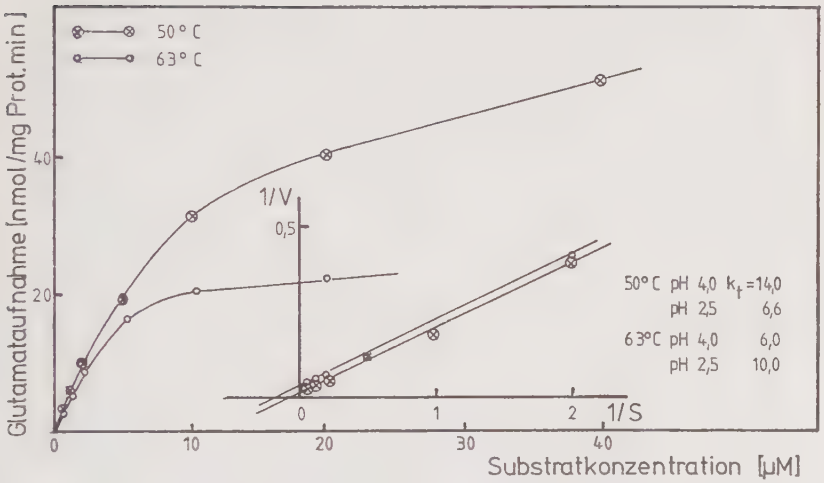


Abb. 40: Glutaminsäureaufnahme beim Wildtyp (pH 4,0, 50 und 63°C) bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen, reziproke Darstellung der Kinetik sowie die für den Wildtyp ermittelten Transportkonstanten.

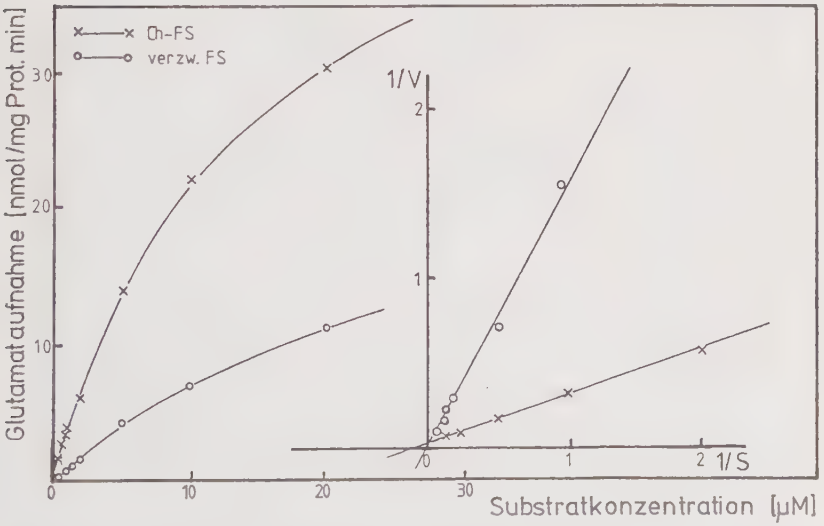


Abb. 41: Glutaminsäureaufnahme von C 2 (pH 4,0, 63°C) bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen in Abhängigkeit des FS-Musters, reziproke Darstellung der Kinetik.

3.5.10. 2. Glutaminsäuretransport

In Abb. 40 ist die Aufnahmekinetik von ^{14}C-Glutaminsäure dargestellt vom Wildtyp bei 50 und 63°C, pH 4. Die Transportkonstanten liegen höher als beim Lysintransport. Das Diagramm läßt nicht auf das Vorhandensein mehrerer Aufnahmesysteme für Glutaminsäure schließen. Die Ermittlung der Transportrate für die Mutante C 2 ergab im Falle der Zellen mit cyclischen FS Verhältnisse wie beim Wildtyp mit K_t= 8,3 µM (50°C, pH 4,0) und 13,3µM(63°C, pH 4,0), während die Mutante mit verzweigten FS eine wesentlich schlechtere Substrataufnahme zeigte: K_t=29 µM bei 50°C, pH 4 sowie 50µM bei 63°C pH 4,0 (Abb. 41). Die Lineweaver-Burk-Kurven in Abb. 41 haben einen gemeinsamen Punkt auf der 1/V-Achse, was auf einen kompetitiven Effekt hindeutet. Abb. 42 zeigt die Aufnahmerate der Mutante mit cyclischen FS mit und ohne verzweigte Aminosäuren im Medium. Die Aminosäuren wurden erst 30 min vor dem Versuch in der normalen Fütterungskonzentration zugegeben, so daß ein Einfluß auf das FS-Muster in der kurzen Zeit ausgeschlossen werden konnte. Die Kinetik läßt deutlich erkennen, daß der Glutaminsäuretransport kompetitiv durch die als FS-Vorstufen verwendeten verzweigten Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin gehemmt wird.
Der Versuch wurde wiederholt, diesmal mit Zellen die anstelle der verzweigten Aminosäuren die entsprechenden kurzkettigen, verzweigten Fettsäuren im Medium hatten (Isovalerat 0,1 µM, 2-Methylbutyrat 0,05 µM). Überraschenderweise gab es auch hier Interferenzen, wiederum war ein kompetitiver Effekt vorhanden (K_t=8 µM ohne und 20 µM mit verzweigten FS). Die experimentellen Bedingungen wurden abermals abgewandelt. Eine Stunde vor der Transportmessung wurden die Zellen zweimal gewaschen, um die FS-Vorstufen zu entfernen. Bei dieser Vorgehensweise ergaben sich noch schlechtere Werte. Die Kultur mit cyclischen FS erreichte eine K_t von 13,3 µM, die mit verzweigten FS 40µM bei 50°C, pH 4. Da die Transportwerte bei beiden FS-Mustern schlechter wurden, beeinträchtigt die Zellen offenbar der Wasch-

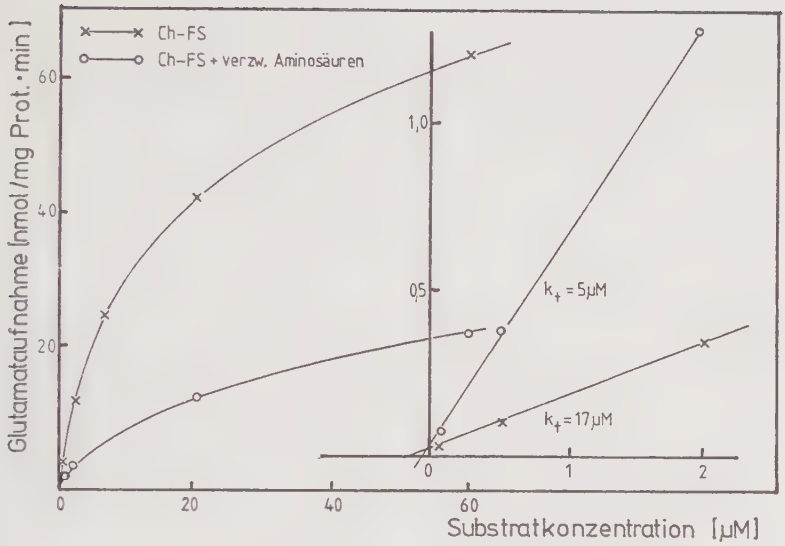


Abb. 42: Glutaminsäureaufnahme von C 2 mit cyclischen FS mit und ohne verzweigte Aminosäuren bei pH 4,0 und 50°C, reziproke Darstellung der Kinetik.

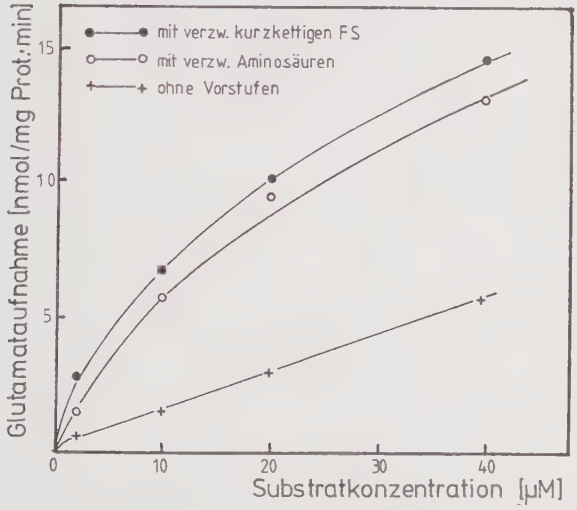


Abb. 43: Glutaminsäureaufnahme von C 2 mit verzweigten FS nach dem Waschen der Zellen mit und ohne FS-Vorstufen bei pH 4,0, 50°C.

vorgang und die damit verbundenen Temperaturunterschiede. Dies konnte jedoch beim Wildtyp nicht bestätigt werden, da hier in einem Versuch mit und ohne zweimaliges Waschen eine Stunde vor der Aufnahmemessung in beiden Fällen genau die gleichen Aufnahmeraten erreicht werden konnten.
In einem weiteren Experiment mit der Mutante mit verzweigten FS (Abb. 43) konnte gezeigt werden, daß die gewachsenen Kulturen nach dem Waschen mit FS-Vorstufen weiterinkubiert, normale Transportraten zeigen, ohne Vorstufen jedoch eine um ca. 66% erniedrigte Aufnahme aufweisen.
Aus diesen Ergebnissen läßt sich folgern, daß die Mutanten nicht ohne FS-Vorstufen über längere Zeit, d.h. über den für die Aufnahmeversuche benötigten Zeitraum, ohne Funktionsverluste inkubiert werden können. Andererseits können in Gegenwart dieser Vorstufen keine vergleichbaren Daten über den Glutamattransport erhalten werden, dieses Transportsystem also hinsichtlich der Zielsetzung der Versuche als ungeeignet angesehen werden muß.

3.5.10.3. Desoxyglucosetransport

Bei der Messung des ^{14}C-Desoxyglucosetransportes ergab sich wiederum das Problem, die Zellen vor dem Aufnahmeversuch waschen zu müssen, um die C-Quelle zu entfernen.

Die für den Wildtyp erhaltenen Aufnahmeraten waren starken Schwankungen unterworfen, was sich in entsprechend unterschiedlichen V_{max}-Werten ausdrückte, die K_t-Werte blieben jedoch immer im gleichen Bereich (Tab. 12). Dies läßt auf eine unterschiedliche Lebensfähigkeit der Zellen schließen, obwohl jeweils nur gut gewachsene Vorkulturen verwendet wurden.
Die naheliegendste Erklärung für die unterschiedlichen V_{max}-Werte war die Schädigung der Zellen durch den Waschprozeß. Mit einem Biophotometerversuch konnte gezeigt werden, daß die kürzeste lag-Phase, bzw. die höchste OD nach einer bestimmten Inkubationszeit nach dem Waschen bei einer Waschtemperatur von 25 - 40°C erreicht wurde. Zellen, die bei tieferen Temperaturen gewaschen wurden, wuchsen langsamer an.

Tab 12: Desoxyglucoseaufnahme beim Wildtyp in Abhängigkeit der Umweltbedingungen.

50°C	pH	4,2	K_t	1,4 µM	V_{max}	0,2
		2,6		3,3		1,4
63°C		4,2		2,0		1,3
		2,6		1,8		0,4

Andererseits war die Glucoseaufnahme bei 30°C Waschtemperatur am besten bei pH-Werten der Waschflüssigkeit im physiologischen Bereich. Höhere pH-Werte, die beim Waschen einen eventuellen Protoneneinstrom beim Abkühlen der Kultur verhindern könnten, führten zu etwas geringeren Aufnahmewerten. Da die Kulturen bisher immer bei etwa 30°C gewaschen wurden, ergaben sich aus diesen Erkenntnissen keine neuen Aspekte. Die Möglichkeit, das Waschen zu vermeiden, war durch die Verwendung anderer C-Quellen für die Vorkultur gegeben. Im Biophotometer konnte gutes Wachstum (vergleichbar mit dem auf Glucose) auf Fruktose, Galactose und Caseinhydrolysat festgestellt werden.
Im Transportversuch ergab sich jedoch bei 40 µM Fructose eine 70%ige Hemmung der Glucoseaufnahme bei 1 µM Desoxyglucose, eine 20%ige Verminderung des Transportes bei 20 µM Desoxyglucose. Beide Substrate beeinflussen sich offenbar gegenseitig hinsichtlich ihres Transportes. Bei Galactose und Casaminoacids konnte keine Interferenz mit der Glucoseaufnahme festgestellt werden.
Kulturen, die als C-Quelle mit Casaminoacids gefüttert wurden, zeigten wiederum sehr schlechte Transportraten für Glucose. Die Ursache konnte in einem weiteren Versuch geklärt werden: Kulturen, die Casaminoacids und Glucose als C-Quelle erhielten, transportierten etwa doppelt so viel, wie Kulturen, die nur Casaminoacids zur Verfügung hatten (die Kulturen wurden vor dem Aufnahmeversuch gewaschen). Das läßt darauf schließen, daß die Glucoseaufnahme entweder nicht konstitutiv ist, also induziert werden muß, oder

aber in Abwesenheit von Glucose weniger Carrier gebildet werden.
Die folgenden Experimente wurden nach der ursprünglichen Methode mit Waschen der Zellen durchgeführt, wobei allerdings schwankende V_{max}-Werte nicht zu vermeiden waren. Auszuschließen war, daß diese durch den unterschiedlichen Zustand der Vorkultur zustande kommen, da nur gut wachsende Kulturen bei etwa gleicher OD verwendet wurden.
In Abb. 44 sind die Transportkonstanten der Zellen mit cyclischen und verzweigten FS dargestellt.
Während die Transportkonstanten der Zellen mit cyclischen FS bei den verschiedenen Umweltbedingungen im Bereich derer des Wildtyps lagen, ergab sich bei den Mutanten mit verzweigten FS eine sehr schwache und unregelmäßige Aufnahme, die in reziproker Darstellung nicht linear war. Da die Aufnahme durch CCCP teilweise nur zu 50% gehemmt wurde (beim Wildtyp ergab sich bei gleicher CCCP-Konzentration eine 90%ige Hemmung), war der Transport vermutlich von einer beträchtlichen Diffusionskomponente überlagert.
Die Möglichkeit, daß die verzweigten Aminosäuren der Mutante als C-Quelle dienen und dadurch der schlechte Transport bedingt ist, konnte durch entsprechende Versuche am Wildtyp ausgeschlossen werden. Der Wildtyp nimmt in Gegenwart der verzweigten Aminosäuren die Glucose noch etwas besser auf als ohne Aminosäuren.
Durch die nachfolgend beschriebenen Messungen der Atmungsrate konnte eine eventuelle Schädigung der Mutante mit verzweigten FS durch das Waschen der Zellen vor dem Versuch ausgeschlossen werden. Es ist also anzunehmen, daß die unterschiedlichen Transportleistungen der Mutanten auf die verschiedenen FS-Muster zurückzuführen sind. Der Carrier für die Glucoseaufnahme ist demnach mit verzweigten FS nicht optimal funktionsfähig, während sich mit cyclischen FS Wildtypeigenschaften ergeben. Ein Biophotometerversuch zeigte, daß die Mutanten ab einer Glucosekonzentration von etwa 500 µM wachsen können, unabhängig vom FS-Muster; bei höheren Konzentrationen des Substrats wird also auch von den Zellen mit cyclischen FS genügend Glucose aufgenommen, um normales

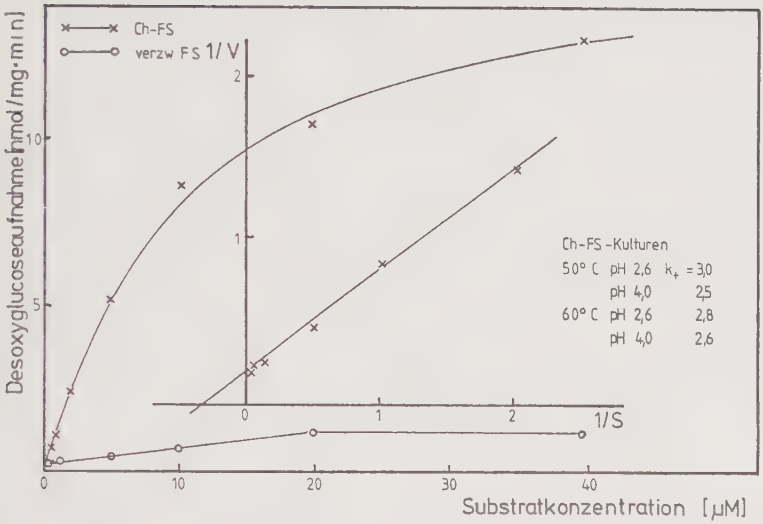


Abb. 44: Desoxyglucoseaufnahme von C 2 (50°C, pH 2,6) bei verschiedenen Substratkonzentrationen in Abhängigkeit des FS-Musters. Reziproke Darstellung und Transportkonstanten der Zellen mit cyclischen FS unter unterschiedlichen Umweltbedingungen.

Wachstum zu gewährleisten.
Der Glucosetransport wird nicht nur durch den Verlust des Protonengradienten gehemmt (durch CCCP 20 µM), sondern auch durch DCCD (500 µM). DCCD bindet an eine Untereinheit der membrangebundenen ATPase und verhindert damit die Energiegewinnung durch den Protonenrückstrom. Der Glucosetransport wird demnach nicht direkt durch das elektrochemische Membranpotential sondern über ATP energetisiert.

3.5.11. Messung der Atmungsrate

Um den Effekt des Waschens und der darauffolgenden Inkubation der Zellen ohne C-Quelle auf die physiologische Aktivität besser beurteilen zu können, wurde die Atmungsrate ge-

messen über die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs der Zellen. Die Kulturen mit cyclischen und verzweigten FS wurden behandelt wie vor den Transportversuchen, d.h. zweimal gewaschen und in MM ohne Glucose inkubiert. Von Zeit zu Zeit wurde an 2-ml-Proben der Sauerstoffverbrauch gemessen, bezogen auf das Protein.
Abb. 45 und 46 zeigen den Sauerstoffverbrauch der Mutante C 2 bei 50°C und 60°C (pH 4, MM) nach dem Waschen der Zellen. Die Daten zeigen, daß in dem zeitlichen Bereich, in dem die Transportversuche durchgeführt wurden, kein großer Unterschied zum Sauerstoffverbrauch der Vorkultur besteht, die Zellen durch den Waschvorgang hinsichtlich ihrer Stoffwechselaktivität nicht geschädigt werden und auch noch genügend Reservestoffe vorhanden sind, um eine hohe Atmungsrate aufrechtzuerhalten, unabhängig vom FS-Muster. Auffällig ist die höhere Atmungsrate der Mutante mit verzweigten FS bei 60°C.

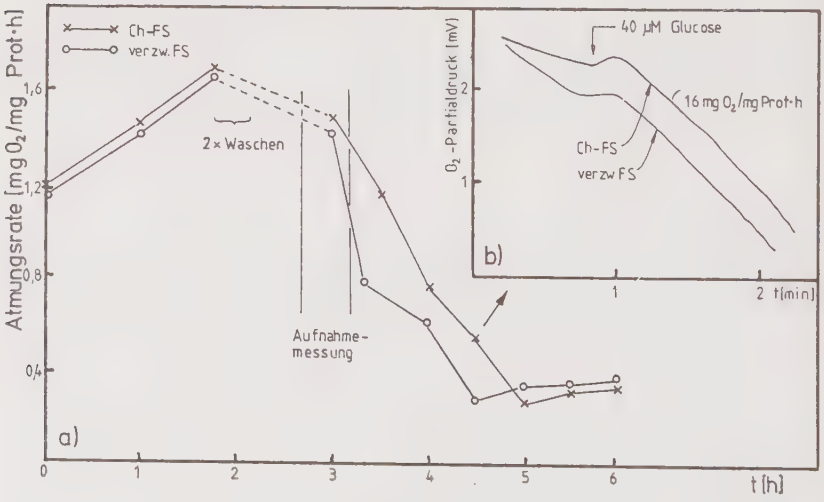


Abb. 45: a) Atmungsrate der Mutante C 7 in MM, pH4 bei 50°C vor und nach dem Waschen. Nach dem Waschen wurde ohne C-Quelle inkubiert.
b) Ansteigen der Atmungsrate nach einem Glucosepuls.

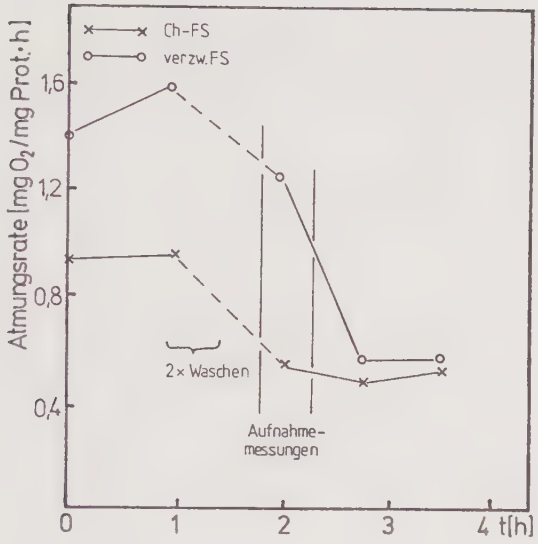


Abb. 46: Atmungsrate der Mutante C 2 in MM, pH 4 bei 60°C vor und nach dem Waschen. Nach dem Waschen Inkubation ohne C-Quelle.

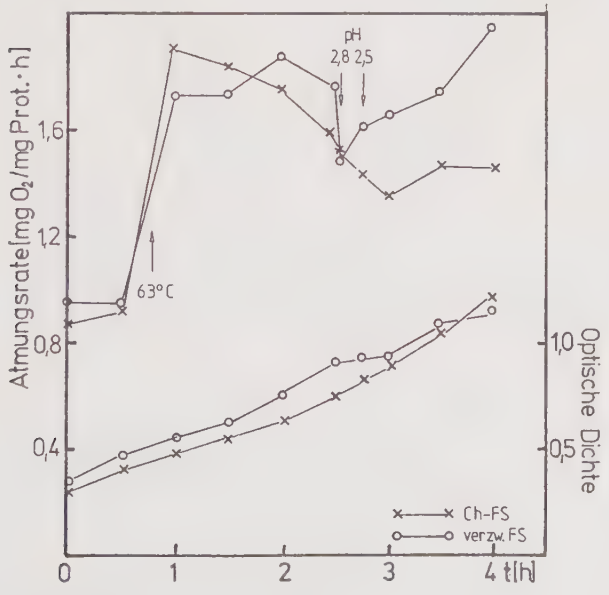


Abb. 47: Atmungsrate von C 2 in MM nach Steigerung der Temperatur und der Protonenkonzentration. Wachstum der beiden Kulturen während des Versuchs.

Die Kulturen sprechen in jeder Versuchsphase nach dem Waschen spontan innerhalb von Sekunden auf den Glucosepuls (40 µM) an (Abb. 45). Die schlechte Glucoseaufnahme der Mutante mit verzweigten FS ist also offenbar nicht dem Waschvorgang anzulasten.
In Abb. 47 ist die Atmungsrate bei Temperaturerhöhung und pH-Erniedrigung dargestellt (MM). Die bei M 13 beobachtete lag-Phase nach Temperaturerhöhung konnte bei den beim zweiten Screening isolierten Mutanten nicht nachgewiesen werden. Die Temperaturerhöhung wird durch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch beantwortet, der jedoch nach pH-Erniedrigung bei der Mutante mit cyclischen FS auf einen niedrigeren Wert absinkt. Die Mutanten mit verzweigten FS steigern die Atmung besonders nach der pH-Änderung auf einen sehr hohen Wert, bei gleichzeitiger Verminderung der Wachstumsrate. Dies vermittelt den Eindruck, daß die Mutante ohne cyclische FS durch extreme Bedingungen einen hohen Energiebedarf hat, bei gleichzeitig vermindertem Wachstum, die cyclischen FS also eine bessere Anpassung an solche Umweltbedingungen gestatten. Denkbar wäre auch eine höhere Atmungsrate durch ineffektivere ATP-Produktion im Falle der Zellen mit verzweigten FS.

3.5.12. Hemmstoffe der Sterolsynthese

Die folgenden Versuche hatten das Ziel, einen spezifischen Hemmstoff der Hopanoidsynthese zu finden. Getestet wurden Substanzen, die die Sterolsynthese bei Eukaryonten hemmen. Die Hemmung der Hopanoidsynthese könnte weitere Erkenntnisse über die Funktion dieser Lipide liefern.

3.5.12.1. Compactin

Compactin wurde von ENDO (1981)(Abb. 48) beschrieben als Hemmstoff der 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-reduktase. An Säugerzellen trat eine 50%ige Hemmung von L-Zellen bei einer Konzentration von 20 µg/l auf. Die Hemmung ließ sich durch Mevalonsäure aufheben.

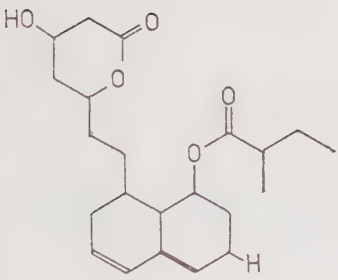


Abb. 48: Compactin

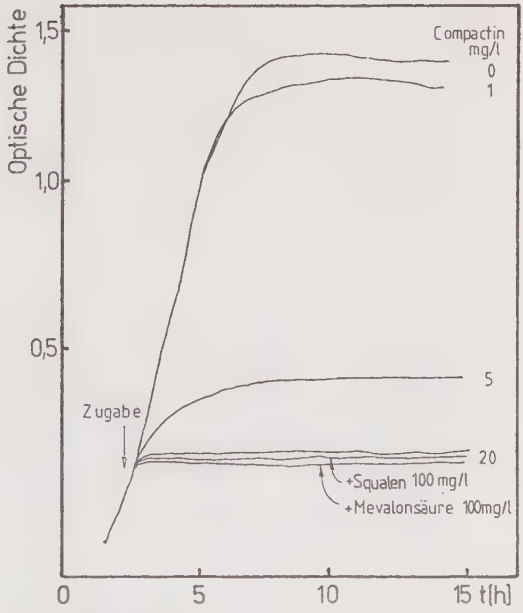


Abb. 49: Hemmung des Wachstums von B. acidocaldarius durch Compactin in MM, 50°C, pH 4.

B. acidocaldarius wird bei 5 mg/l im Wachstum total gehemmt (Abb. 49), die Hemmung ließ sich weder durch Mevalonsäure (10-100 mg/l) noch durch Squalen (10-100 mg/l) aufheben.

3.5.12.2. AMO 1618

AMO 1618 (Abb. 50) hemmt die Squalenepoxidcyclase in Tabakpflanzen und Rattenleber (DOUGLAS & PALEY 1978), es inhibiert

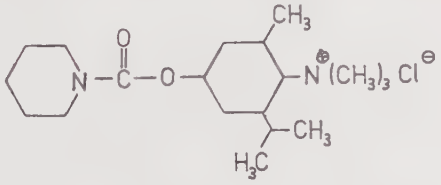


Abb. 50: AMO 1618 ((2-Isopropyl-5-methyl-4-trimethylammoniumchlorid)-phenyl-1-piperidincarboxylat)

auch die Cyclisierungsreaktion von Squalen in B. acidocaldarius in vitro (SECKLER & PORALLA 1986).
Im Plattendiffusionstest mit eingegossenen Organismen ließ sich bei B. acidocaldarius bei 50 und 60°C, pH 4 keine Wachstumshemmung nachweisen (Stammlösung 1 mg/ml EtOH/H_2O 1/1, 2-4 x 50µl auf Filterpapierstreifen).
Im Biophotometer ließ sich ebenfalls keine Hemmung zeigen bei Konzentrationen von 1-1000µM, an Wildtyp und Mutante C 7, 55°C, pH 4.

3.5.12.3. Azasqualene

Die Azasqualen-Derivate (Abb. 51) wurden von DELPRINO et al. (1983) beschrieben als Hemmstoffe für pflanzliche Squalenepoxidcyclasen. An B. acidocaldarius und Z. mobilis wurden verschiedene Derivate, die mir von L. CATTEL und M. ROHMER zur Verfügung gestellt wurden, getestet.

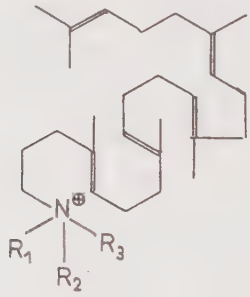


Abb. 51: Azasqualen

Von CATTEL:	C_3	$R_1 = CH_3$, $R_2 = R_3 = H$
	C_6	$R_1 = R_2 =$ Propyl, $R_3 = H$
	C_7	$R_1 =$ Propyl, $R_2 = R_3 = H$
	C_8	$R_1 = R_2 = R_3 = H$
Von ROHMER:	C_R	$R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$

Wachstumshemmschwelle:

B. acidocaldarius, Biophotometer MM, 50°C, pH 4

C_3 zwischen 5 und 20 µM totale Hemmung
C_6 zwischen 3 und 10 µM totale Hemmung
C_7 zwischen 3 und 10 µM totale Hemmung
C_8 bei 10 µM totale Hemmung
C_R bei 30 µM bei 50°C und 10-15 µM bei 61°C totale Hemmung.

Mutante C 7

C_R 53°C, pH 4 20-30 µM und
63°C, pH 4 10-20 µM totale Hemmung unabhängig vom FS-Muster der Mutante.

Z. mobilis, wurde als ein weiterer Organismus, der Hopanoide enthält, untersucht.

Mit C_3, C_6, C_8, C_R konnte keine reproduzierbare Wachstumshemmung weder in Standkulturen (2% EtOH, Komplexmedium, pH 5, 30°C) noch im Biophotometer unter den gleichen Bedingungen bei eingesetzten Konzentrationen von 1-500 µM erzielt werden.

C_R hemmt Z. mobilis im Biophotometer auf synthetischem Medium (aus BELAICH & SENEZ 1965) mit 100 µM; der Organismus wächst jedoch schlecht auf diesem Medium unter den Versuchsbedingungen (pH 5, 30°C). Nach ROHMER (pers. Mitteilung) hemmt Azasqualen nur bei ganz geringem Zelltiter (10^6 Zellen/50 ml).

Plattendiffusionstest bei B. acidocaldarius:

Auf Platten mit eingegossenen Organismen wurden Filterpapierstreifen mit 50 µl C_6 (0,8 mg/ml EtOH) gelegt. Es wurde versucht die Wachstumshemmung aufzuheben durch Filterstreifen mit

- Diplopterol (Hopen-22-ol, 3 mg/ml $CHCl_3$/MeOH 2/1, 50 und 200 µl pro Streifen)
- Hopanglycolipid (3 mg/ml EtOH, 50 und 200 µl pro Streifen).

- Diplopterol und Hopanglycolipid gleichzeitig in den obigen Konzentrationen.

Es war in keinem Fall eine Beeinflussung der Wachstumshemmung zu beobachten.

Hopananalyse bei B. acidocaldarius:

Azasqualen C_7 wurde zu wachsenden Kolbenkulturen in einer Konzentration von 5 µM bei OD = 0,55 zugegeben. Diese Konzentration hemmt das Wachstum nicht vollständig. Die OD der Kultur nahm bis zur Ernte nach 4 Stunden auf 0,69 mit Azasqualen bzw. auf 1,05 ohne Azasqualen zu. Versuchsbedingungen: MM, pH 4, 55°C.

Hopangehalt:

Azasqualen	3 mg Hopan/25 mg Lipid,	bzw.	7,5 mg/g TG
Kontrolle	2,3 mg "		4,4 mg/g TG.

Die Werte lassen nicht auf eine Hemmung der Hopanoidbiosynthese durch Azasqualen schließen. Bei den Hopananalysen waren größere Unterschiede in der Hopenmenge der beiden Ansätze zu bemerken. Die Kontrolle hatte 58,8% Hopen (bezogen auf den Hopanacetat-Peak), die Azasqualen-Kultur nur 15,5%. Möglicherweise erfolgt doch eine Cyclasehemmung, was sich in einem vermehrten Verbrauch des freien Hopens für die Synthese der längerkettigen Hopanoide äußert.

3.5.13. Zusammenfassung der Ergebnisse mit den Mutanten II

Die beim zweiten Screening isolierten und charakterisierten Mutanten zeigten ein weitgehend cyclohexanfettsäurenfreies FS-Muster verglichen mit M 13. Der Gehalt an cyclischen FS war bei Fütterung mit verzweigten Aminosäuren in der Regel unter 2%, so daß Einflüsse der cyclischen FS auf die "bulk"-Lipidphase auszuschließen waren.

- Die Mutanten mit verzweigten FS wuchsen schlechter bei gleichzeitig hohen Temperaturen und niedrigen pH-Werten.
- Bei ihnen wird dem Fehlen cyclischer FS durch höhere Hopanmengen in der Membran begegnet.

- Physikochemische Messungen lassen auf eine größere Packungsdichte und somit eine bessere Stabilität der Membranen mit cyclischen FS bei extremen Umweltbedingungen schließen.
- Eine teilweise erhöhte Empfindlichkeit der Zellen mit verzweigten FS gegenüber membranschädigenden Substanzen wurde beobachtet.
- Die Kinetik von Transportvorgängen unterscheidet sich in Abhängigkeit des FS-Musters.

Erschwert wurden die Versuche vielfach durch das schlechte Anwachsen der Organismen bei Änderungen der Umweltbedingungen, z.B. Übergang von Platten- auf Flüssigkulturen, Weiterimpfen von Flüssigkulturen, Anwachsen nach dem Waschen der Zellen, Lebendzellzahlbestimmung durch Ausplattieren. Dadurch bedingt waren die Versuche schlecht reproduzierbar und mußten zuweilen öfters wiederholt werden. Die Mutanten reagierten recht empfindlich auf viele der im Medium angebotenen Effektoren, die vermutlich wegen ihres z.T. lipophilen oder detergenzienartigen Charakters bereits von außen die Membranfunktion beeinträchtigen, so daß die Versuchsergebnisse oft schwierig zu interpretieren waren.

4. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit den physiologischen Auswirkungen, die sich aus dem Fehlen der normalerweise als Hauptfettsäurekomponenten vorhandenen Cyclohexanfettsäuren in einer Fettsäuremutante von Bacillus acidocaldarius ergeben.

Ein erster Hinweis auf die Funktion bestimmter Fettsäuren kann aus der Anpassung des Fettsäuremusters an unterschiedliche Umwelttemperaturen erhalten werden. Dieser als homeoviskose Adaptation bezeichnete Prozeß gibt eine sinnvolle Erklärung für die verschiedenen Fettsäuretypen in einem einzigen Organismus (SINENSKY 1974). Die diesbezüglichen Daten von verschiedenen Arbeitsgruppen ergeben kein einheitliches Bild bei B. acidocaldarius.

DE ROSA et al. (1974) begründen die Adaptationen im Fettsäuremuster auf verschiedene Umweltbedingungen im wesentlichen über den hohen Energiebedarf der Zellen bei niedrigen pH-Werten sowie den verringerten Sauerstoffgehalt des Mediums bei hohen Temperaturen, was jeweils die Bildung cyclischer Fettsäuren aus energetischen Gründen begünstigt. Eine Erhöhung der Belüftungsrate bewirkte eine Verminderung des Anteils cyclischer Fettsäuren. Es dürfte jedoch schwierig sein, die genaue Ursache zu finden, angesichts der komplexen Einflüsse der Belüftungsrate auf den Zellstoffwechsel in Batchkulturen.

OSHIMA & ARIGA (1975) stellten in ihren Untersuchungen fest, daß ein erhöhter Gehalt cyclischer Fettsäuren eher bei mittleren Bedingungen, d.h. bei 55 bis 60°C und pH 3 bis 4, auftritt. Außerdem steigt der Gehalt dieser Fettsäuren mit der Glucosekonzentration an (um 10% bei 10facher Konzentration), was im Hinblick auf die Biosynthese einleuchtend ist, jedoch im physiologischen Bereich der Nährstoffkonzentration sicher keine Rolle spielt.

Beide Autorengruppen haben jedoch nicht diskutiert, daß die biologische Funktion von Fettsäuren nach heutigem Kenntnisstand in der Aufrechterhaltung eines bestimmten physikalischen Membranzustandes, insbesondere der Fluidität, bei un-

terschiedlichen Umweltbedingungen verstanden wird (MELCHIOR 1982). Daher ist zu fordern, daß das Fettsäuremuster nicht nur von der Energetik der Biosynthese von FS-Vorstufen reguliert wird, sondern eher über die bei verschiedenen Umweltbedingungen benötigten Membraneigenschaften.
Bei E. coli z.B. wird das FS-Muster temperaturabhängig bei der Kettenverlängerung gesteuert, wobei entweder cis-Vaccensäure oder Palmitinsäure entsteht (DE MENDOZA & CRONAN 1983).
Bei B. acidocaldarius kommen zu schwankenden Umgebungstemperaturen zusätzlich Unterschiede in der Protonenkonzentration um den Faktor 1000 innerhalb des Wachstumsbereiches. Dies läßt auf eine komplexe Regulation des Membranzustandes und damit auch des FS-Musters schließen. Messungen von PORALLA (pers. Mitteilung) ergaben bei hohen und niedrigen pH-Werten eine Zunahme der cyclischen Fettsäuren mit der Temperatur, wobei bei niedrigen pH-Werten insgesamt mehr cyclische Fettsäuren vorhanden sind. Der letzte Befund ist auch aus den Daten von DE ROSA et al. (1974) zu extrahieren. Diese Messungen ließen auch regulatorische Effekte bezüglich der Kettenlänge erkennen. Eigene Versuche mit Temperaturshifts zeigten einen bevorzugten Einbau der C-19-Cyclohexan-FS beim Übergang zu höheren Temperaturen bzw. der C-17-Cyclohexan-FS bei Temperaturabsenkung.
Zusammenfassend läßt sich sagen, daß eine Beziehung besteht zwischen extremen Umweltbedingungen und der vermehrten Bildung cyclischer Fettsäuren. Eine Regulation des Membranzustandes über die Kettenlänge der Cyclohexan-FS dürfte bei bestimmten Bedingungen, z.B. bei raschen Anpassungsvorgängen, stattfinden. Die Adaptation müßte jedoch noch eingehender untersucht werden, genauso wie die umweltbedingten Änderungen im Bereich der in geringeren Mengen vorhandenen geradkettigen und verzweigten FS. Sinnvoll wäre hier der Einsatz kontinuierlicher Kulturen, die es gestatten, an einem definierten Punkt der Wachstumskurve bei konstanter Nährstoff- und Sauerstoffversorgung zu arbeiten. Die Isolierung eines mesophilen Bakteriums mit Cyclohexan-FS (SUZUKI et al. 1981) scheint den obigen Ergebnissen und Folgerungen auf den ersten Blick zu widersprechen. Doch hier

zeigte sich eine sehr deutliche Abhängigkeit der Menge cyclischer FS von der Temperatur und bei konstanter Temperatur vom pH-Wert mit den gleichen, jedoch besser ausgeprägten Tendenzen wie bei B. acidocaldarius. Die Schwankungen im Gehalt der einzelnen FS sind bei Brevibacterium pusillum extremer als bei B. acidocaldarius ; dies läßt auf einen etwas andersartigen Regulationsmechanismus schließen. Die Menge cyclischer Fettsäuren bewegt sich temperatur- und pH-abhängig zwischen 15 und 80%, die C-19—Cyclohexan-FS dürfte mit weniger als 4% keine wesentliche Rolle spielen. Über die Lebensgewohnheiten dieses Organismus ist so gut wie nichts bekannt, es wäre denkbar, daß er eine ökologische Nische bewohnt (er wurde aus vermutlich salzhaltigen Ölschlämmen isoliert), in der ihm die cyclischen FS Selektionsvorteile bieten können, zumal das Bakterium in einem recht großen pH-Bereich wachsen kann.
Ähnliches ist möglicherweise auch für eine andere Bakterienart zu vermuten, die vor kurzem von OHYA et al. (1986) aus Böden mit hohem Zinkgehalt angereichert wurde, und die gleichfalls Cyclohexanfettsäuren aufweist, wobei der Gehalt dieser FS mit steigender Zinkkonzentration zunimmt. Denkbar wäre eine Verminderung der Membranpermeabilität gegenüber Zink durch den steigenden Gehalt der cyclischen FS.
Ein sehr gewichtiges Argument für das Auftreten cyclischer Lipide bei extremen Umweltbedingungen sind die cyclischen Etherlipide bei den thermoacidophilen Archaebakterien Thermoplasma und Sulfolobus (DE ROSA et al. 1980, FURUYA et al. 1980, LANGWORTHY et al. 1982). Die Cyclisierung nimmt mit steigender Temperatur zu, die Phasenübergangstemperatur dieser Lipide hängt vom Cyclisierungsgrad ab. Besonders dieses Beispiel kann als Modellfall für die konvergente Entwicklung cyclischer Lipidstrukturen bei phylogenetisch entfernten thermoacidophilen Organismen gewertet werden; es bestätigt aber auch den selektiven Vorteil von Cyclohexanfettsäuren.

4.1. STRUKTURANALOGE VON CYCLOHEXANCARBONSÄURE

Die Suche nach Strukturanalogen von Cyclohexancarbonsäure, die die Biosynthese der cyclischen Fettsäuren hemmen, konnte nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Basierend auf der Arbeit von DE ROSA et al. (1974) werden von B. acidocaldarius eine Vielzahl von Vorstufen aufgenommen und in FS eingebaut. Gemeinsames Merkmal all dieser Verbindungen ist die Carboxylgruppe und der lipophile Rest. Dieser Grundbauplan wurde für Strukturanaloge in verschiedenen Richtungen abgewandelt durch Vergrößern, Verkleinern des Ringes, Einführen von Doppelbindungen, Einführen von Heteroatomen im Ring, durch Substituenten am Ring sowie durch Veränderungen an der Carboxylgruppe. Keine dieser Variationen beeinflußte die Biosynthese der cyclischen FS signifikant. Falls die Substanzen dem obigen Grundbauplan einigermaßen entsprachen, konkurrierten sie mit dem natürlichen Substrat und wurden in FS eingebaut, wenn nicht, wurde die Biosynthese nicht beeinträchtigt. Wachstumshemmung trat nur in wenigen Fällen auf. Es wäre denkbar, daß manche Substanzen von der Zelle gar nicht aufgenommen werden, insbesondere geladene, andere wegen der geänderten Polarität von hydrophober oder hydrophiler Gruppe von den weiterverarbeitenden Enzymen nicht akzeptiert werden. Der stark lipophile Charakter mancher Moleküle könnte deren Verfügbarkeit im wässerigen Medium vermindern. Die Kenntnis der Zwischenschritte der Biosynthese zwischen Shikimisäure und Cyclohexancarbonsäure hätte die Suche nach einer geeigneten Hemmsubstanz unter Umständen erleichtert.
Ein angewandter Aspekt wäre die Gewinnung unphysiologischer Fettsäuren, besonders mit Hilfe der cyclohexanfettsäureauxotrophen Mutanten durch Füttern entsprechender Vorstufen. Halogenierte Derivate von Cyclohexancarbonsäure werden eingebaut, bzw. fördern das Wachstum der Mutante, was sich gaschromatographisch in einer neuen Komponente im FS-Muster äußert, die jedoch nicht näher charakterisiert wurde.

4.2. MUTANTENSCREENING

Das erste Mutantenscreening erwies sich als problematisch, gemessen am Verhältnis von Aufwand zu Ausbeute. Zunächst wurde ein Anreicherungsschritt mit zellwandsynthesehemmenden Antibiotika vorgesehen. Die damit verbundenen häufigen Wasch- und Anwachsvorgänge sowie die von den Zellen zu bewältigenden Temperaturunterschiede haben vermutlich die Mutanten mehr geschädigt als den Wildtyp. Das Waschen der Zellen wurde zwar immer bei etwa 25 bis 35°C durchgeführt, höhere Temperaturen, um die Abkühlung der Zellen zu vermeiden, waren aus gerätetechnischen Gründen nicht möglich und auch nicht sinnvoll, da die Organismen dann unter Sauerstoffmangel leiden.
Andererseits war die Wirkung der eingesetzten Antibiotika teilweise recht mäßig, bei schwefelhaltigen war das Auftreten von Schwefelwasserstoff festzustellen, der für die Zellen sehr toxisch ist (SONNLEITNER, pers. Mitteilung). Da der Umgang mit thermoacidophilen Organismen noch mikrobiologisches Neuland darstellt, gemessen an den Erfahrungen und Methoden, die für länger bekannte Bakterien vorliegen, muß sicherlich mit Problemen gerechnet werden. Die an neutrophilen Organismen erworbenen Methoden müssen in der Regel erst den thermoacidophilen Verhältnissen angepaßt werden.
Die Versuche mit Brevibacterium zeigten, daß das Arbeiten im mesophilen Bereich auch mit unbekannten Bakterien wesentlich einfacher und vor allem reproduzierbarer ist.
Das zweite Mutantenscreening wurde gemäß den obigen Überlegungen ohne Anreicherungsschritt durchgeführt; die Zellen wurden nach einer Erholungsphase in Komplexmedium mit Vorstufen nach Verdünnung direkt auf Platten ausgestrichen, und es konnten relativ schnell eine Anzahl der gewünschten Mutanten isoliert werden. Das Erkennen der Mutanten wurde erschwert durch die Eigenschaften der Cyclohexancarbonsäure, die zur Selektion auf den überstempelten Platten eingesetzt wurde. Die Substanz ist einerseits schlecht wasserlöslich, hat andererseits einen hohen Dampfdruck, so daß eher ein Verdunsten als ein Diffundieren im Agar anzunehmen ist.

Bei späteren Versuchen hat sich tatsächlich gezeigt, daß das Wachstum der Mutanten auf Agarplatten mit Minimalmedium und Cyclohexancarbonsäure nicht sehr gut ist, verglichen mit Flüssigkulturen, und deshalb Mutanten schlecht zu identifizieren sind.
Im allgemeinen wird für die Isolierung von FS-Mutanten ein Detergenz zugegeben, um die Löslichkeit von lipophilen Vorstufen zu verbessern (HARDER et al. 1972, SILBERT et al. 1973). Dies erwies sich jedoch bei B. acidocaldarius als nicht praktikabel, da bereits geringe Konzentrationen diverser Detergenzien Wachstumshemmung bewirkten.

4.3. WACHSTUM AUF FETTSÄUREVORSTUFEN

Die isolierten Mutanten waren nicht in der Lage ohne Cyclohexanfettsäure-Vorstufen zu wachsen. Es zeigte sich jedoch, daß auch andere Vorstufen die FS-Bedürfnisse der Mutanten erfüllen können. Es liegt also kein spezieller Bedarf für cyclische FS vor, sondern die Eigensynthese der geraden und verzweigten FS, die im Wildtyp in geringeren Mengen vorhanden sind, ist zu gering, um das Wachstum zu ermöglichen. Der Befund von KANEDA (1966), daß bei geringen Biotinkonzentrationen B. subtilis nur 10% der üblicherweise vorhandenen FS zum Wachsen benötigt, läßt sich nicht ohne weiteres auf B. acidocaldarius übertragen.
Gemäß den Fütterungsexperimenten von DE ROSA et al. (1974a) konnten die Mutanten eine Vielzahl von Substraten für die FS-Synthese verwerten. Dies waren zum einen die cyclohexancarbonsäureähnlichen Ringsysteme mit abweichender Ringgröße, ferner die mit Essig- bis Buttersäure substituierten Cyclohexanringe, zum anderen die verzweigten Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin, ihre α-keto-Derivate sowie die entsprechenden kurzkettigen, verzweigten FS. Mit Hilfe der Substanzen aus dem Aminosäurestoffwechsel konnte ein FS-Muster ohne cyclische FS erzeugt werden. Vorzugsweise wurden hier die Aminosäuren gefüttert, da bei den fettsäureartigen Vorstufen wenig oberhalb der wachstumsfördernden Konzentration Wachstumshemmung eintrat. Dies dürfte auf ihrer mit Detergenzien vergleichbaren Wirkung auf die Membran beruhen (FREESE et al. 1973, HERRERO et al. 1985). Die Mutanten

konnten auf Cycloheptancarbonsäure genausogut wachsen wie auf Cyclohexancarbonsäure; das Wachstum auf Cyclopentancarbonsäure war teilweise (je nach Mutante) schlechter. Es war jedoch nicht zu differenzieren zwischen schlechter Aufnahme bzw. Einbau aus strukturellen Gründen oder der schlechteren Membranfunktion der gebildeten Cyclopentan-FS. Da der Wildtyp ebenfalls vergleichsweise wenig dieser Substanz einbaut, könnte der 5er-Ring ein unzureichendes Enzymsubstrat darstellen, zumal Cyclobutancarbonsäure überhaupt nicht mehr eingebaut wird. Cyclohexanpropionsäure erwies sich als gute Vorstufe, das Wachstum auf Cyclohexanessigsäure war schlechter, Cyclohexanbuttersäure hemmte bei den üblichen, normalerweise wachstumsfördernden Konzentrationen. Diese Befunde könnten auf das von LEWIS & MC ELHANEY (1985) beschriebene unterschiedliche physikalische Verhalten geradzahliger und ungeradzahliger Cyclohexan-FS zurückzuführen sein. Die geradzahligen FS wiesen niedrigere Phasenübergangstemperaturen sowie geringere Übergangsenthalpien auf als die ungeradzahligen, physiologisch vorkommenden Cyclohexan-FS. Dies äußert sich in einem geringeren Ordnungsgrad der Membranlipide.

Das Wachstum der Mutanten auf Aminosäuren war bei milden Bedingungen (pH 4, 50°C) mindestens genausogut, eher besser, als auf Cyclohexancarbonsäure. Die höchste Wachstumsrate wurde auf Leucin und Kombinationen von Leucin mit geringeren Mengen der beiden anderen AminosäurenIsoleucin und Valin beobachtet und zwar bei niedrigen als auch bei hohen Temperaturen. Da die verschiedenen Aminosäuren unterschiedliche FS-Typen ergeben (KANEDA 1977), läßt sich durch das Angebot an Vorstufen das FS-Muster variieren, was eine unter bestimmten Umweltbedingungen ungeeignete FS-Zusammensetzung der Membran zur Folge haben könnte. Da jedoch hohe Temperaturen bei mesophilen sowie thermophilen Bakterien mit einem erhöhten Gehalt an iso-C-17-FS sowie einer Anpassung der Kettenlänge innerhalb der iso-C-15-FS und iso-C-17-FS beantwortet werden (FULCO 1984, WEERKAMP & HEINEN 1972 a,b), erschien es günstig, die Mutante hauptsächlich mit Leucin und geringeren Mengen Isoleucin und Valin zu füttern. Dies stand im Einklang mit dem guten Wachstum auf Leucin bei verschiedenen Temperaturen.

Da in der Regel ein höherer Gehalt der längerkettigen C-17-FS vorhanden ist sowie umwelttemperaturbedingte Verschiebungen im FS-Muster auftreten, sind die Mutanten offenbar in der Lage auch ohne cyclische FS eine Temperaturadaptation innerhalb der verzweigten FS durchzuführen, so daß die FS-Zusammensetzung der Membran nicht nur durch die von außen zugegebenen Vorstufenkonzentrationen bestimmt wird.
Mikroorganismen scheinen eine gewisse Toleranzbreite gegenüber experimentell induzierten Verschiebungen im FS-Muster zu besitzen. In der Natur gibt es sicher Bedingungen, die im Labor aus technischen Gründen oder aus Unkenntnis der tatsächlichen Verhältnisse im Biotop nicht realisiert werden können. Aus zahlreichen Versuchen mit FS-Mutanten konnte kein spezifisches Bedürfnis nach bestimmten FS abgeleitet werden, befriedigendes Wachstum bei unterschiedlichen Temperaturen ließ sich mit unterschiedlichen FS als Hauptkomponenten erzielen (CRONAN & GELMANN 1975, MC ELHANEY 1982, SILBERT et al. 1973). Eine Mutante von B. subtilis mit einem Defekt in der Dehydrogenase der verzweigten α-Ketosäuren kann auf jedem einzelnen der normalerweise drei vorhandenen Typen verzweigter FS gut wachsen (WILLECKE & PARDEE 1971). Im Gegensatz zu den Beobachtungen von DE ROSA (1974a) am Wildtyp konnten die Mutanten Valin als FS-Vorstufe nutzen.
Das Vorhandensein cyclischer Fettsäuren sowie die Unfähigkeit von B. acidocaldarius, größere Mengen verzweigter Fettsäuren herzustellen, kann noch unter einem anderen Gesichtspunkt diskutiert werden. Die Synthese verzweigter FS ist eng mit dem Metabolismus der verzweigten Aminosäuren verknüpft und das FS-Muster vom Angebot entsprechender Vorstufen abhängig (KANEDA 1977, WEERKAMP & HEINEN 1971, DARON 1973). Es wäre denkbar, daß sich B. acidocaldarius eine ökologische Nische erobert hat, in der es vorteilhaft ist, die FS-Synthese vom Aminosäurestoffwechsel abzukoppeln. Thermophile Organismen weisen oft eine hohe Wachstumsrate sowie einen hohen Erhaltungsumsatz auf (SONNLEITNER 1980). Die Folge ist ein erhöhter Proteinumsatz und eine gesteigerte Proteinsyntheserate, die wiederum in einem größeren Bedarf an Aminosäuren resultieren. Dieser Bedarf könnte leichter gedeckt werden, wenn FS nicht direkt aus Aminosäuren hergestellt werden.

Da jedoch viele thermophile Mikroorganismen verzweigte FS haben, müßte der niedrige pH-Wert einen zusätzlichen Effekt ausüben, wobei abzuwägen ist, ob der Selektionsdruck der hohen Protonenkonzentration eher eine durch cyclische FS stabilisierte Membran fördert oder eine Entlastung des Aminosäurestoffwechsels bewirkt. Vielleicht spielt beides eine Rolle; die Natur hat das Problem durch die "Erfindung" der cyclischen Fettsäuren gelöst.

Da bei der FS-Synthese bei Bacillen größere Startermoleküle bevorzugt werden (KANEDA 1973), ist der Übergang von Aminosäurederivaten zu der voluminösen Cyclohexancarbonsäure leichter nachvollziehbar als z.B. zu Acetyl-CoA, das bei vielen anderen Pro- und Eukaryonten als Startermolekül für geradkettige FS dient.

Viele FS-Mutanten werden direkt mit ganzen FS gefüttert, z.B. E. coli (WILLE et al. 1975). Dies war hier nicht möglich, da die aus B. subtilis isolierten FS in Ethanol gelöst zugegeben, das Wachstum der Mutanten nicht förderten. Das könnte an der schlechten Verfügbarkeit der lipophilen Moleküle in wässeriger Lösung liegen. Der Einsatz von Detergenzien als Lösungsvermittler mußte ausscheiden: B. acidocaldarius erwies sich als sehr empfindlich gegenüber verschiedenen Detergenzien in Konzentrationen, die weit unter denen lagen, die bei anderen FS-Mutanten eingesetzt wurden (SILBERT et al. 1973, WILLE et al. 1975).

Die isolierten shikimisäureauxotrophen Mutanten wuchsen auf Shikimisäure gut, schlechter jedoch auf einer Mischung von Endprodukten, die von Shikimisäure aus gebildet werden, inklusive der FS-Vorstufe Cyclohexancarbonsäure. Das Bedürfnis nach FS-Vorstufen bei diesen Mutanten ist ein weiterer Beweis für das Abzweigen der Biosynthese der Cyclohexan-FS bei Shikimisäure. Das schlechtere Wachstum auf den Endprodukten könnte einerseits auf unzulängliche Konzentrationen der einzelnen Komponenten zurückzuführen sein oder auf das Fehlen einer oder mehrerer unbekannter Substanzen. Die neben den aromatischen Aminosäuren in kleineren Mengen benötigten Endprodukte (Benzoesäurederivate, Chinonmetabolismus) sind unterschiedlich bei verschiedenen Organismen (HASLAM 1974).

Bei den Kreuzfütterungsversuchen mit den Mutanten, die nur in Flüssigkulturen funktionierten, konnte eine wachstumsfördernde Wirkung der Kulturflüssigkeiten der Mutanten C 2 und C 7 auf C 8 und C 10 festgestellt werden. Dies bedeutet, daß C 2 und C 7 den Biosyntheseblock später haben als die beiden anderen Mutanten. Für eine relativ späte Unterbrechung der Biosynthesekette der cyclischen FS spricht auch die Extrahierbarkeit der angehäuften Zwischenprodukte mit Ethylacetat, mit dem sich hydroxygruppenhaltige Substanzen wie Shikimisäure nicht aus wässerigem Medium extrahieren lassen. Mit einer geeigneten Analytik könnte man die ausgeschiedenen Intermediärprodukte aus dem Kulturfiltrat isolieren und identifizieren. Mit den anderen Mutanten konnten keine verwertbaren Resultate erzielt werden, da diese Stämme unter den Versuchsbedingungen nicht ausreichend stabil waren.
Für das Mißlingen der Kreuzfütterung auf Festmedium könnte das schlechte Wachstum und die damit verbundene geringe Ausscheidung von Zwischenprodukten auf Agarplatten mit Minimalmedium verantwortlich gemacht werden.

4.4. WACHSTUM BEI VERSCHIEDENEN UMWELTBEDINGUNGEN

Bei den Wachstumsversuchen im Biophotometer ergab sich für die Mutante 13 (1. Screening) mit verzweigten FS bei 50°C, pH 4 die gleiche Wachstumsrate wie für die Zellen mit cyclischen FS; bei extremen Bedingungen wie niedriger pH-Wert und hohe Temperaturen konnte nur noch die Mutante mit Cyclohexan-FS wachsen. Die Unterschiede in der Wachstumsrate waren recht extrem und konnten in dieser Ausprägung mit den später isolierten Mutanten unter abgeänderten Versuchsbedingungen nicht bestätigt werden. Die zunächst angewandten Versuchsbedingungen erwiesen sich nicht als ideal. Bei hohen Temperaturen im Biophotometer ist die Sauerstoffversorgung aufgrund der Gerätekonzeption zumindest bei Kulturen mit hohem Zelltiter nicht optimal, wenn nicht sogar wachstumslimitierend. Außerdem wurden bei diesen ersten Versuchen die niedrigen pH-Werte in den Röhrchen vor dem Autoklavieren eingestellt, so daß die Kulturen beim Animpfen von der Vorkultur schlagartig mit den neuen höheren Protonenkonzentrationen konfrontiert wurden und nach diesem Schock teilweise gar nicht anwuchsen. Bei späte-

ren Versuchen mit den anderen Mutanten wurden im wesentlichen Kolbenkulturen verwendet. Die niedrigen pH-Werte wurden im Kolben und im Biophotometer stufenweise durch Zupipettieren eingestellt, nachdem die Zellen angewachsen waren.

Die beim zweiten Screening isolierten Mutanten zeigten fettsäurebedingte Wachstumsunterschiede bei niedrigen pH-Werten. Die Mutanten mit verzweigten FS verminderten die Wachstumsrate nach Einstellen des neuen pH-Wertes und zwar um so stärker, je größer die pH-Differenz war. Nach etwa einer Verdopplung der optischen Dichte im Anschluß an die pH-Änderung kommt das Wachstum bei pH-Werten unter 3 zum Stillstand. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei hohen Temperaturen. Temperaturerhöhung alleine bewirkt bei mäßigem pH-Wert keine wesentlichen Unterschiede in der Wachstumsrate der Zellen mit cyclischen und verzweigten FS.

Die Ergebnisse zeigen, daß sich das Fehlen cyclischer FS im wesentlichen auf die Sensitivität gegenüber hohen Protonenkonzentrationen auswirkt.

Wie bei allen acidophilen Bakterien, ist auch bei B. acidocaldarius der zellinterne pH-Wert in der Nähe des Neutralpunktes bei pH 6,5 bis 6,9 (MICHELS & BAKKER 1985). Über der Membran muß also ein pH-Gradient von 2 bis 4,5 pH-Einheiten aufrechterhalten werden. Die Protonenkonzentration ändert sich demnach um den Faktor 1000 innerhalb der für den Organismus tolerierbaren pH-Werte der Umwelt. Die künstliche Acidifizierung des Cytoplasmas durch Nigericin auf pH 3,5 hatte den Tod der Zellen zur Folge (GUFFANTI et al. 1979). Der genaue Mechanismus mit dem dieser Protonengradient aufrechterhalten wird, ist noch nicht geklärt. Zur Energiegewinnung dient auch bei Acidophilen der durch die Atmungskette aufgebaute elektrochemische Protonengradient (MITCHELL 1961). Bei neutrophilen Bakterien setzt sich dieser aus einem Protonengradienten und einem daraus resultierenden Membranpotential, innen negativ, zusammen. Bei Acidophilen wird das elektrochemische Potential im wesentlichen durch den hohen Protonengradienten gebildet; das Membranpotential ist stark abgesenkt bzw. innen leicht positiv (COBLEY & COX 1983). Die Werte des elektochemischen Potentials gleichen daher denen von neutrophilen Organismen. Durch das nicht vor-

handene bzw. eher leicht positive Membranpotential wird dem übermäßigen Eindiffundieren von Protonen durch Entstehen eines Diffusionspotentials entgegengewirkt. Es darf jedoch kein weiterer Ladungsaustausch längs des Konzentrationsgradienten durch andere Kationen über der Membran stattfinden, der das Protonendiffusionspotential neutralisieren würde. Aus diesen Überlegungen heraus muß für die Membran von Acidophilen eine hohe Undurchlässigkeit für Protonen als auch für andere Ionen gefordert werden, die zum einen durch die Regulierbarkeit von Ionenpumpen und Carriern gegeben ist, andererseits auch eine Eigenschaft der Membranlipide sein muß. In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, daß besondere Eigenschaften der Cyclohexanfettsäuren eine Rolle spielen könnten, und damit die höhere Empfindlichkeit der Zellen mit verzweigten FS gegenüber niedrigen pH-Werten erklärt werden kann. Möglicherweise haben Membranen ohne cyclische FS eine höhere Protonenpermeabilität, was vermehrte energetische Aufwendungen der Zelle zur Folge hat, um der Ansäuerung des Cytoplasmas entgegenzuwirken. Da die Protonenpermeabilität bei Temperaturerhöhung ansteigt (ROSSIGNOL et al. 1982), andererseits der Erhaltungsstoffwechsel der Zellen ebenfalls zunimmt, könnte dieser erhöhte Energiebedarf bei hohen Temperaturen im Falle der Mutanten mit verzweigten FS in einem Wachstumsstop resultieren. Diese Aspekte werden an anderer Stelle wieder aufgegriffen und weitergeführt.

4.5. AZALEUCINRESISTENTE MUTANTEN

Mit der Isolierung von azaleucinresistenten Mutanten wurde das Ziel verfolgt, Überproduzenten von Leucin zu finden, die ohne Zufüttern von verzweigten Aminosäuren als Fettsäurevorstufen wachsen können (WARD & ZAHLER 1973). Die selektionierten Azaleucinresistenten der cyclohexanfettsäureauxotrophen Mutanten benötigten jedoch immer noch die externen Vorstufen zum Wachstum.
Die Resistenz gegen Strukturanaloge ist sicher nicht nur durch Überproduktion des natürlichen Substrates zu erreichen, sondern auch durch eine Vielzahl von anderen Mechanismen, z.B. durch Transportmutationen oder veränderte Enzyme, die das Analoge nicht mehr akzeptieren. Da die benötigten

Konzentrationen an Leucin vergleichsweise hoch sind, müßte auch die Überproduktion entsprechend hoch sein, was möglicherweise nicht in einem einzigen Mutationsschritt erreicht wird. Zumindest müßte ein Testsystem entwickelt werden, um das Maß der Überproduktion festzustellen.

4.6. MESSUNG DER ATMUNGSRATE UND DES ATP-GEHALTES VON M 13

Mit Hilfe von Temperaturschockexperimenten sollte das Verhalten der Mutante 13 in Abhängigkeit vom FS-Muster gegenüber raschen Temperaturänderungen verfolgt werden. Da diese Versuche im Biophotometer kein reproduzierbares Resultat lieferten, wurden diese Versuche in Kolben durchgeführt. Hier ergab sich bei rascher Temperaturerhöhung von 50 auf 65°C eine 2stündige lag-Phase für die Mutante mit verzweigten FS, während die Zellen mit cyclischen FS bei den neuen Bedingungen weiterwuchsen. Diese lag-Phase wurde durch Messung des Sauerstoffverbrauchs sowie des ATP-Gehaltes der Zellen als eine Periode mit niedriger Atmungsrate und niedrigem ATP-Gehalt charakterisiert. Bei den später isolierten Mutanten konnte die lag-Phase unter den gleichen Versuchsbedingungen nicht mehr nachgewiesen werden; sie muß als eine spezifische Eigenschaft der Mutante 13 angesehen werden. Die lag-Phase war begleitet von Änderungen im FS-Muster: Das Verhältnis von verzweigten zu cyclischen FS veränderte sich vom Anfang bis zum Ende der lag-Phase von 23:1 auf 6:1. Die Biosynthese der cyclischen FS war bei Mutante 13 offenbar nicht vollständig blockiert, es handelt sich also um eine "leaky"-Mutante; ein Mindestgehalt dieser FS von etwa 5% konnte immer nachgewiesen werden. Die Veränderungen im FS-Muster vermitteln den Eindruck, daß die Mutante nach Temperaturerhöhung einen größeren Prozentsatz cyclischer FS benötigt, um bei der hohen Temperatur weiterwachsen zu können. Es findet also ein Anpassungsvorgang statt, der in ähnlicher Form auch am Wildtyp beobachtet werden konnte, und der es der Mutante ermöglichte, nach Erreichen eines höheren Gehaltes cyclischer FS weiterzuwachsen. Da die anderen Mutanten dieses Verhalten nicht zeigten, muß bei ihnen ein anderer Anpassungsmecha-

nismus an schnell gestiegene Umwelttemperaturen vorhanden sein. Im Bereich der FS war bei diesen Mutanten keine Abnahme der verzweigten FS zu beobachten, sondern es wurde innerhalb dieser FS ein größerer Prozentsatz der langkettigen C-17-FS eingebaut, im wesentlichen iso-C-17 mit nahezu 70% der Gesamtfettsäuren.

Bezüglich der lag-Phase abweichende Befunde liefern Atmungsmessungen bei steigenden Temperaturen. Die Inkubationstemperatur wurde kontinuierlich gesteigert, allerdings nicht so rasch wie beim vorigen Versuch. Die Zellen mit cyclischen FS und der Wildtyp verbrauchten Sauerstoff bis nahezu 80°C, die Mutante 13 mit verzweigten FS bis ca. 75°C, also weit oberhalb der maximalen Wachstumstemperatur. Hier konnte keine lag-Phase beobachtet werden, das FS-Muster wurde allerdings nicht verfolgt, da dieser Versuch zeitlich vor dem zuvor diskutierten durchgeführt wurde. Die Atmungsrate der Kulturen geht nach spätestens 30 min zurück, und die Zellen sterben.

Auch beim raschen Einstellen von niedrigen pH-Werten hört die Atmung der Zellen mit verzweigten FS bei höheren pH-Werten auf als die der Mutanten mit cyclischen FS, allerdings sind die Unterschiede, verglichen mit den Wachstumsversuchen, recht klein. Es ist anzunehmen, daß die Zellen den pH-Sprung kurzzeitig überstehen, jedoch dabei nicht mehr wachsen können.

Nicht ganz auszuschließen ist bei der Mutante 13 ein behinderter Transport der verzweigten Aminosäuren in die Zelle bei den hohen Temperaturen während der lag-Phase. Andererseits konnte die doppelte Vorstufenkonzentration das Versuchsergebnis nicht beeinflussen. Eine weitere Ursache für die lag-Phase könnte die temperatursensitive Synthese der verzweigten FS sein, d.h. bei hohen Umgebungstemperaturen wird die Synthese dieser FS zugunsten der cyclischen FS im Rahmen der Temperaturadaptation vermindert. Unverständlich ist jedoch hier das Weiterwachsen der Zellen nach der lag-Phase und das Wachsen bei höhen Temperaturen (Abb. 14).

Interessant sind in diesem Zusammenhang die Befunde an B. subtilis (SHEU & FREESE 1972). In dieser Arbeit wurden die gleichen Effekte auf Atmungsrate und ATP-Gehalt fest-

gestellt nach Zugabe kurzkettiger FS, die möglicherweise die Membranstuktur verändern, bzw. die Elektronentransportkette entkoppeln. Im vorliegenden Fall könnte es durch die rasch ansteigenden Temperaturen bei den Mutanten mit verzweigten FS zu einer vorübergehenden Störung der Membranintegrität kommen, die gleichfalls zu einer Schädigung des Energiegewinnungssystems führt. Da die Zellen jedoch nach der lag-Phase weiterwachsen, müssen sie in der Lage sein, sich den neuen Bedingungen anzupassen. Dafür spricht auch die nicht vorhandene lag-Phase bei langsamerem Temperaturanstieg.

Die gemessenen Atmungsraten konnten wegen des Bezugs auf eine bestimmte optische Dichte der Kultur nicht mit denen von anderen Organismen verglichen werden. Die später im Zusammenhang mit den Transportexperimenten durchgeführten Sauerstoffverbrauchsmessungen wiesen gute Übereinstimmung mit den von GUFFANTI et al. (1979) bei B. acidocaldarius ermittelten Werten auf.

Der ATP-Gehalt der Zellen lag ebenfalls im Rahmen des von GUFFANTI et al. (1979) gemessenen. Insgesamt gesehen ist der ATP-Gehalt etwas höher als die Durchschnittswerte von mesophilen Organismen (KARL 1980). Ob dies eine generelle Eigenschaft thermophiler Organismen ist, müßte an anderen wärmeliebenden Bakterien bestätigt werden. Das zumindest beim Wildtyp festgestellte Ansteigen des ATP-Gehaltes mit der Wachstumstemperatur könnte auf einem hohen ATP-Bedarf bei den sich bei diesen Bedingungen ergebenden höheren Wachstumsraten und Stoffwechselumsätzen beruhen. Ein Zusammenhang zwischen ATP-Gehalt und Wachstumsrate wurde auch bei anderen Organismen beobachtet (CHAPMAN & ATKINSON 1977). Als kritischer Punkt bei der ATP-Bestimmung erweist sich die Extraktionsmethode der Zellen. Da der zelluläre ATP-Umsatz sehr rasch erfolgt, für Thermophile dürfte das ganz besonders zutreffen, muß die Extraktion der Zellen sehr schnell ablaufen. Es sind viele Extraktionsmethoden in Gebrauch, deren Eignung für einen bestimmten Organismus unterschiedlich ist, was vergleichende Untersuchungen bewiesen (LUNDIN & THORE 1975, LARSSON & OLSSON 1979). Die hier verwendete, relativ einfach durch-

führbare alkalische Extraktion mit Kaliumhydroxid ergab der von GUFFANTI et al. (1979) benutzten Extraktion mit Hyperchlorsäure vergleichbare, eher etwas höhere Werte, so daß auf eine Eignung dieser Extraktionsmethode für B. acidocaldarius geschlossen werden kann.
Mit der Mutante 13 wurden keine weiteren Versuche mehr durchgeführt, da der besonders bei langsamem Wachstum vorhandene Restgehalt cyclischer FS im Bereich von 5 bis 15% die Interpretation der Versuchsergebnisse erschwerte, wenngleich er keine ausgeprägten Effekte auf die Bulk-Lipid-Phase ausüben dürfte.

4.7. HOPANGEHALT

Bei den qualitativen Analysen des Lipidmusters gab es Hinweise auf unterschiedliche Mengen Hopanglycolipid bei den Mutanten in Abhängigkeit des FS-Musters. Diese Hinweise bestätigten sich bei quantitativer Bestimmung des Hopanoidgehaltes (Hopan-Glycolipid und Tetrahydroxybacteriohopan).
Es ergab sich folgendes Bild: Die Mutanten mit verzweigten FS hatten bei gleichen Umweltbedingungen mehr Hopanoide, in manchen Fällen die doppelte Menge, in der Membran als die Zellen mit cyclischen FS, bezogen auf die Lipidmenge oder auf das Trockengewicht der Zellen. Andererseits war bei den Mutanten mit steigender Temperatur sowie fallendem pH-Wert jeweils ein Ansteigen der Hopanmenge zu registrieren, wobei die durch das FS-Muster bedingte Differenz immer erhalten blieb. Aus den mit den extrahierten Lipiden angefertigten Dünnschichtchromatogrammen war zu erkennen, daß die Unterschiede hauptsächlich durch Hopan-Glycolipid, weniger durch freies THBH verursacht werden. Das Wachstum der Fermenterkulturen war vergleichbar, die Zellen wurden etwa in der gleichen Phase geerntet, damit sollte die Lipidzusammensetzung nicht von Wachstumsphase und -rate abhängig sein. Der Gesamtlipidgehalt, bezogen auf das Zelltrockengewicht, war bei den Mutanten mit verzweigten FS um ca. 10% niedriger als bei den Zellen mit cyclischen FS. Daraus ergab sich auch ein niedrigerer Absolutgehalt an FS, der durch den erhöhten Hopangehalt noch verstärkt wurde. Dies könnte

durch den erhöhten molekularen Flächenbedarf von Lipiden mit verzweigten FS erklärt werden. Möglich wäre auch ein verändertes Protein-Lipid-Verhältnis. Als Fehlerquelle bei der Bestimmung des Hopanoidgehaltes kann das eventuell unterschiedliche Extraktionsverhalten der Lipide mit cyclischen und verzweigten FS angeführt werden. Da sich aber die Hopanoidgehalte in Abhängigkeit des FS-Musters sehr stark unterscheiden, dürfte dies, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle spielen. Änderungen des Hopanoidgehaltes bezüglich der Umweltbedingungen wurden bereits unter anderen Fragestellungen gefunden: PORALLA et al. (1984) konnte bei B. acidocaldarius ein Ansteigen der Hopanoide mit der Temperatur und Protonenkonzentration beobachten, bei Zymomonas mobilis nehmen die Hopane mit der Ethanolkonzentration im Medium (BRINGER et al. 1985) sowie mit der Temperatur zu (SCHMIDT, pers. Mitteilung). Ein neuer Aspekt ist der hier vorliegende Befund: Der Hopangehalt wird auch vom Fettsäuremuster beeinflußt. Da die Hopane als Membranverfestiger besonders gegenüber extremen Umweltbedingungen diskutiert werden (PORALLA et al. 1984, KANNENBERG et al. 1985), könnten bei der Mutante mit verzweigten FS die vermehrten Hopane als Ersatz für den Verlust der cyclischen FS angesehen werden, also ein strukturelles Erfordernis darstellen, um den physikalischen Zustand der Membran bei den ungewöhnlichen Umweltbedingungen aufrechtzuerhalten. Daraus ergibt sich auch eine spezielle Funktion der Cyclohexanfettsäuren, die von verzweigten FS alleine nicht erfüllt werden kann, obwohl diese mit den cyclischen FS bezüglich der physikalischen Eigenschaften durchaus Gemeinsamkeiten haben (LEWIS & MC ELHANEY 1985). Hopane können in Struktur und Funktion als Steroidäquivalente bei Prokaryonten bezeichnet weren. Diese Rolle wurde in einer Reihe von physikochemischen Experimenten nachgewiesen. Dabei konnte gezeigt werden, daß die wichtigsten Membranfunktionen von Sterolen auch von den Hopanoiden wahrgenommen werden (BENZ et al. 1983, BISSERET et al. 1983, KANNENBERG et al. 1983, 1985, 1986, PORALLA et al. 1980). Die Funktionen von Membransterolen werden in Übersichtsartikeln von YEAGLE (1985) sowie DEMEL & DE KRUYFF

(1976) dargestellt. Funktionelle Gemeinsamkeiten ergeben sich aus der Molekülform (starres Ringsystem mit Seitenkette, ein polares Ende), aus der in beiden Fällen kondensierenden Wirkung der Moleküle auf Membranlipide, resultierend in einem höheren Ordnungsgrad der Acylketten, aus der Löschung der Lipidphasenübergänge in Gegenwart von Cholesterol oder Hopanoiden und aus der stark verringerten Permeabilität von cholesterin- oder hopanoidhaltigen Liposomen gegenüber kleinen Molekülen.
Es läßt sich aus den obigen Daten sowohl eine strukturelle als auch eine funktionelle Analogie von Steroiden und Hopanoiden ableiten. Man sieht die Hopane heute als evolutionäre Vorläufer der Steroide, ihre Biosynthese erfolgt ohne Sauerstoff bei der Cyclisierung von Squalen (OURISSON et al. 1979, PORALLA 1982).
Interessanterweise konnten mit Untersuchungen, die an Modellmembranen mit ω-cyclohexanfettsäurehaltigen Phospholipiden durchgeführt wurden, Resultate erzielt werden, die denen der Hopanoid- bzw. Cholesterinexperimente durchaus ähnlich sind. Für Phosphatidylcholinliposomen mit cyclischen FS konnte gleichfalls eine erniedrigte Glycerin- bzw. Glucosepermeabilität oberhalb des Phasenüberganges nachgewiesen werden, verglichen mit Liposomen, die andere FS gleicher Kettenlänge beinhalten (ENDO et al. 1982, KANNENBERG et al. 1984, SUNAMOTO et al. 1982). Kalorimetrische sowie NMR-Daten lassen auf eine größere Packungsdichte der Lipide unterhalb des Phasenüberganges schließen, dies gilt für ungeradzahlige Kettenlängen der Cyclohexan-FS, andererseits auf einen höheren Ordnungsgrad der Acylketten oberhalb des Übergangs im flüssigkristallinen Zustand (KANNENBERG et al. 1984, LEWIS & MC ELHANEY 1985), verglichen mit Lipiden mit geradkettigen FS. Der höhere Ordnungsgrad wird erreicht durch die besseren hydrophoben Wechselwirkungen der voluminösen Cyclohexanringe, durch die eingeschränkte Drehbarkeit benachbarter Moleküle. Als Konsequenz ergibt sich eine geringere Permeabilität von Liposomen mit Cyclohexanfettsäuren. Lipide mit cyclischen FS weisen also einen "eingebauten Cholesterin-

effekt" auf (KANNENBERG 1983).
Auf der Basis dieser Daten ist es durchaus zu verstehen, wenn bei den Mutanten mit verzweigten FS das Fehlen der Cyclohexanfettsäuren durch vermehrten Einbau von Hopanoiden zu einem gewissen Grad funktionell kompensiert werden kann. Einerseits wird dadurch der durch den Verlust der cyclischen FS hervorgerufene Effekt auf die physiologischen Leistungen der Mutante verwischt, andererseits bestätigen sich damit die aus Modellsystemen gewonnenen Erkenntnisse. Modellsysteme, die gleichzeitig aus Hopanoiden und Phosphatidylcholinen mit cyclischen FS bestehen, lassen weitere Schlußfolgerungen zu: Da das Hopanmolekül, verglichen mit Cholesterin, umgekehrt in der Membran orientiert ist, also der polycyclische Teil des Moleküls weiter der Membranmitte zu lokalisiert ist, zum anderen die Ringe der cyclischen FS gleichfalls in der Membranmitte liegen, sind stärkere hydrophobe Wechselwirkungen im Zentrum des Bilayers sowie ein damit verbundener höherer Ordnungsgrad oberhalb des Phasenübergangs zu erwarten. Dies sollte sich günstig auf das Permeabilitätsverhalten solcher Membranen auswirken. KANNENBERG et al.(1985) konnte dies für Tetrahydroxybakteriohopan nachweisen. Die Rolle des in B. acidocaldarius in größeren Mengen vorkommenden Hopanglycolipids konnte in dieser Beziehung jedoch nicht eindeutig definiert werden. Nachteilig auf die Versuchsergebnisse aus den Modellsystemen mit Cyclohexanfettsäuren erwies sich sicherlich die Verwendung der geradzahligen Cyclohexanfettsäure C 18, für die von LEWIS & MC ELHANEY (1985) ein deutlich von den ungeradzahligen physiologischen FS abweichendes Verhalten festgestellt wurde.
Bei den bereits besprochenen Wachstumsversuchen konnte eine erhöhte Sensitivität der Mutanten ohne cyclische FS gegenüber hohen Protonenkonzentrationen beobachtet werden. Hier lassen sich Verbindungen knüpfen zu Ergebnissen, die ursprünglich im Zusammenhang mit Cholesterin gewonnen wurden. Nach PAPAHADJOPOULOS et al. (1971) kann Membranpermeabilität in zwei Schritte unterteilt werden. Einmal der Eintritt des gelösten Teilchens in die Membran, zum zweiten das Diffundieren durch die Membran. Der erste Schritt ist abhängig vom

hydrophoben Effekt, der zweite von der Teilchengröße. Cholesterin vermindert die Permeabilität von Kationen stärker als die von Glucose. Nach den Ausführungen von YEAGLE (1985) beeinflußt Cholesterin möglicherweise den ersten Schritt, indem es durch stärkere hydrophobe Wechselwirkungen einen höheren Ausschluß von Wasser aus dem Membraninneren bewirkt, und dadurch die Löslichkeit von Ionen im Bilayer verringert. Auf molekularer Ebene läßt sich das folgendermaßen verständlich machen: Permeabilität kann als Springen zwischen Fehlstellen im Molekülverband der Membran verstanden werden. Diese Fehlstellen entstehen beispielsweise durch Trans-gauche-Isomerisierungen, sogenannte "Kinken". Deren Häufigkeit wird vermindert durch Cholesterin, zumindest im Bereich der ersten 10 C-Atome der FS-Kette. Eine geringere Anzahl Defektstellen ist die Folge, woraus sich letztendlich die reduzierte Permeabilität ableitet. Dieses Modell erklärt auch die Abnahme der Löslichkeit hydrophober Moleküle mit zunehmender Sterolkonzentration. Diese werden beim Eintritt gehindert oder, wenn sie schon in der Membran vorhanden sind, herausgepreßt.
In einem analogen Schluß kann die Verminderung von Fehlstellen in der Lipidphase auch durch Hopanoide und in schwächerem Maße durch Cyclohexanfettsäuren erreicht werden. Wie oben bereits erwähnt, bewirken cyclische FS einen höheren Ordnungsgrad in der flüssigkristallinen Membran, dadurch wird die Zahl der Trans-gauche-Isomerisierungen reduziert, resultierend in einer geringeren Wasser- bzw. Ionenlöslichkeit zwischen den Lipiden.
Eine andere Betrachtungsweise führt zum gleichen Ergebnis: NICHOLS & DEAMER (1980) stellten für Liposomen eine abnorm hohe Protonendurchlässigkeit fest, die mehrere Größenordnungen über der von Cl^-, Na^+ und K^+ liegt. Der Protonenfluß über die Membran erfolgt also offenbar nach anderen Prinzipien als der anderer kleiner Ionen. Vorgeschlagen werden Mechanismen, die nach dem "Hydrogen-Bonded-Chain-Mechanism" ablaufen (Übersicht in NAGLE & TRISTRAM-NAGLE 1983, DEAMER 1984). Hier springen Protonen über ein System von über Wasserstoffbrückenbindungen verbundenen hydrophilen

Resten von Proteinen oder Wassermolekülen durch die Membran. Dieser Vorgang kann in geregelter Form über die Seitenketten von Proteinen ablaufen, diskutiert werden hier ATPasen, Bacteriorhodopsin, oder ungeordnet als dynamischer flexibler Kanal, der auf der Existenz von Wassermolekülen im hydrophoben Membranbereich beruht.
Beide Ansätze zeigen, daß die Protonenpermeabilität auf dem Vorhandensein von Wassermolekülen im Membraninneren beruhen könnte. Ein Ausschluß dieses Wassers durch Vermeiden von Fehlstellen in der Lipidpackung, hervorgerufen durch starre Moleküle wie Steroide, Hopane, Cyclohexanfettsäuren, Cyclopentanringe bei Archaebakterien, könnte sich günstig auswirken auf die Toleranz von Organismen gegenüber extremen Protonenkonzentrationen. Auch der Ersatz von Cyclohexanfettsäuren durch Hopanoide im Falle der Mutante mit verzweigten FS kann demnach als adaptive Anpassung an den niederigen pH der Umwelt aufgefaßt werden. Die Regulation dieser Anpassung wirft weitere Probleme auf. Gemäß den Befunden am Wildtyp (PORALLA et al. 1984) müßte die Biosynthese der Hopane von Temperatur und pH abhängig sein. Denkbar wäre zumindest für die Temperaturabhängigkeit ein temperaturgesteuertes Enzym, wie es bei E. coli für die Synthese der cis-Vaccensäure nachgewiesen wurde (DE MENDOZA & CRONAN 1983). Da jedoch bei den Mutanten der Hopanoidgehalt vom FS-Muster abhängt und bei Zymomonas mobilis der Hopanoidgehalt mit der Ethanolkonzentration verändert wird (BRINGER et al. 1985), müssen für diese Fälle andere Mechanismen gefordert werden.
Auch in diesem Fall kann wieder auf Ergebnisse der Cholesterolforschung zurückgegriffen werden: SINENSKY und KLEINER (1981) studierten den Effekt exogener Veränderungen des physikalischen Membranzustandes von Chinese-hamster-ovary-Zellen auf die Aktivität der 3-Hydroxyl-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG CoA-Reduktase), ein Enzym, das am Anfang der Isoprenoid- bzw. Cholesterinsynthese steht. Die Membranveränderung wurde durch Zugabe von Ethanol oder eines Detergenz erreicht und resultierte in einem 2- bis 3fachen Anstieg der Cholesterinmenge in den Microsomen durch erhöhte Aktivität der HMG CoA-Reduktase. Damit verbunden war Protein- und RNA-Synthese; es wurde eine homeoviscose Adaptation des Membranzustandes erzielt. Diese Daten lassen einen

Zusammenhang erkennen zwischen dem physikalischen Membranzustand und der davon abhängigen Expression von Genen. Daß derartige Vorgänge auch bei anderen Organismen ablaufen, ist anzunehmen. Der Einfluß von Sterolen auf das FS- und Phospholipidmuster konnte für Hefemutanten nachgewiesen werden (BOTTEMA et al. 1985, LOW et al. 1985), bei Tetrahymena pyriformis konnte eine Beziehung zwischen dem exogenen Sterolangebot und der FS-Zusammensetzung aufgezeigt werden (FERGUSON et al. 1975). Es ist jedoch auch der Fall bekannt, bei dem exogenes Sterol keine Veränderung des FS-Musters bewirkt, wie eine Studie an E. coli zeigt (EATON et al. 1981). Ein Zusammenhang zwischen der passiven Permeabilität der Plasmamembran und der FS-Zusammensetzung der Lipide wurde für Acholeplasma laidlawii B (DE KRUYFF et al. 1973, MC ELHANEY et al. 1973, SILVIUS et al. 1980) und für E. coli (HAEST et al. 1972) gezeigt. Ein erhöhter Gehalt an ungesättigten FS, also eine größere Membranfluidität, erhöhte die Permeabilität für Ionen und Nichtelektrolyte. Bei Mycoplasma mycoides verloren cholesterolverarmte Zellen die Fähigkeit, bei niedrigen pH-Werten zu wachsen, aufgrund der erhöhten Membranpermeabilität für Ionen (LE GRIMELLEC & LEBLANC 1978). Auch diese Daten weisen auf die große Bedeutung der Membran als Permeabilitätsbarriere bei extremen pH-Werten hin, wobei den Lipiden im Hinblick auf die passive Permeabilität die entscheidende Rolle zukommt.
Nach MC ELHANEY (1984) könnte die obere Wachstumstemperatur für einen Organismus durch die Integrität der Membran bestimmt sein. Bei steigender Temperatur wird der Punkt erreicht, an dem die thermische Energie der Lipidmoleküle die membranstabilisierenden hydrophoben Wechselwirkungen übersteigt und die Membran ihre Integrität einbüßt. Die Eigenschaften der Steroide, Hopanoide und Cyclohexanfettsäuren ermöglichen höhere hydrophobe Kräfte und gewährleisten auch bei extremen Umweltbedingungen die Membranintegrität.

4.8. PHYSIKOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

Mit einigen Membranlipiden wurden Messungen des spezifischen Volumens durchgeführt, die Aussagen liefern über die Dichte der Lipidphase. Für die Mutantenlipide mit verzweigten FS wurden deutlich höhere Werte für das spezifische Volumen, also eine geringere Dichte, gemessen als für die Lipide mit cyclischen FS. Die Lipide aus Wildtypzellen, die bei 65°C angezogen wurden, erwiesen sich dichter als die von Zellen, die bei niederer Temperatur angezogen wurden; dies traf zumindest für Lipide der Mutanten mit verzweigten FS zu. Die Tragweite dieser Meßwerte ist schwierig abzuschätzen, da die Methode im vorliegenden Fall für die schlecht definierbaren Gesamtlipide der Organismen angewendet wurde, die zudem noch gewisse Verunreinigungen enthalten können. Die Densimetrie wurde bisher auf gut definierte reine Lipide oder Lipidmischungen angewandt (SCHMIDT & KNOLL 1985). In diesen Fällen liefert die Methode Informationen über Phasenübergänge und volumetrische Daten von Molekülen.
Die erhaltenen Daten lassen sich recht gut mit den bisherigen Informationen über Lipide mit Hopanoiden und Cyclohexanfettsäuren in Einklang bringen. Die größere Dichte der Wildtyplipide bei 65°C könnte auf dem höheren Gehalt an Hopanoiden und cyclischen FS beruhen, deren bekannte kondensierende Wirkung das Membraninnere verdichtet. Bei den Mutanten dominiert offensichtlich der Effekt, der durch die verzweigten FS bzw. durch das Fehlen der cyclischen FS verursacht wird über dem höheren Hopanoidgehalt dieser Zellen. Die Lipide mit Cyclohexanfettsäuren haben eine wesentlich höhere Dichte als die entsprechenden Lipide mit verzweigten FS und mehr Hopanoiden. Lipide mit verzweigten FS wirken membranfluidisierend. Wegen der Verzweigung am Kettenende verringern sich die Wechselwirkungen zwischen den Ketten, und die Moleküle bilden eine lockerere Packung (KANNENBERG et al. 1983, MANTSCH et al. 1985, SILVIUS & MC ELHANEY 1979). Dies äußert sich in einem höheren spezifischen Volumen solcher Lipide, das auch durch einen größeren Anteil von Hopanoiden nicht die niedrigeren Werte von cyclohexanfettsäurehaltigen Lipiden erreicht. Phasenübergänge sind bei den Li-

piden vom Wildtyp sehr schwach ausgeprägt, während sie besonders bei den Mutantenlipiden mit verzweigten Fettsäuren deutlich zu erkennen sind, was auf größere Volumenänderungen während des Phasenüberganges schließen läßt. Dies spricht für die geringere thermische Stabilität der Lipide mit verzweigten Fettsäuren, die sich auch in den thermischen Ausdehnungskoeffizienten ausdrückt. Da die Phasenumwandlungen bei ca. 35°C in allen Fällen abgeschlossen sind, dürften sie sich auf den physiologischen Temperaturbereich nicht auswirken.
Die aus den Kurven für das spezifische Volumen ermittelten Volumenausdehnungskoeffizienten geben recht gut die Tendenz wieder, die sich aus den mit reinen Lipiden gewonnen Daten ergibt (BLUME, pers. Mitteilung). Die thermischen Ausdehnungskoeffizienten der Lipide mit cyclischen FS von Mutante und Wildtyp entsprechen dem von reinem Phosphatidylcholin mit Cyclohexanfettsäuren, zieht man die zusätzliche kondensierende Wirkung von Hopanoiden in Betracht, bzw. stimmen nahezu überein mit dem Wert von Cyclohexanfettsäure-Phosphatidylcholin mit 50% Cholestesterol. Andererseits liegen die Ausdehnungskoeffizienten der Mutantenlipide mit verzweigten FS wesentlich höher wie auch die Werte der reinen Substanzen mit entsprechenden FS.
Auch anhand dieser Ergebnisse erweisen sich die Lipide mit cyclischen FS stabiler bei hohen Temperaturen und starken Temperaturerhöhungen.
Im Gegensatz zu den Dichtekurven lassen die Kalorigramme von den Lipiden auch beim Wildtyp den Phasenübergang erkennen. Die Hauptumwandlung der Wildtyplipide hängt von der Wachstumstemperatur ab; die Temperaturdifferenz der beiden gut sichtbaren Hauptumwandlungen entspricht der Differenz der Wachstumstemperaturen. Es könnte also eine homeoviscose Anpassung vorliegen. Die Mutantenlipide zeigen hinsichtlich des Phasenüberganges keine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit, der größte Teil der Umwandlung läuft bei den Mutanten mit verzweigten FS bei etwas tieferen Temperaturen ab. Die Lipide mit cyclischen FS haben etwas schärfere Phasenumwandlungen; dies könnte daran liegen, daß bei diesen nur Cyclohexanfettsäuren C 17 und C 19 als Hauptkomponenten unter den FS vorliegen, während bei den Lipiden mit verzweigten FS 5 bis 6

Hauptkomponenten vorhanden sind, resultierend in einer Verbreiterung des Phasenüberganges.
Abschätzungen über den Phasenübergang bezüglich freier Energie und Kooperativität lassen sich wegen der ungenügenden Charakterisierbarkeit der Lipidgemische nicht durchführen.

Abschließend läßt sich sagen, daß Lipide mit Cyclohexanfettsäuren eine höhere Dichte sowie eine geringere thermische Ausdehnung als solche mit verzweigten FS aufweisen im Bereich der Wachstumstemperaturen von B. acidocaldarius. Ein gesteigerter Hopanoidgehalt ist in Gegenwart verzweigter FS kein vollständiger Ersatz für den Verlust cyclischer FS, was durch die Wachstumsversuche bei unterschiedlichen Umweltbedingungen bestätigt wird.

4.9. WIRKUNG MEMBRANSCHÄDIGENDER AGENZIEN

Die komplexen Wirkungen von Ethanol auf Mikroorganismen sind gut dokumentiert (INGRAM & BUTTKE 1984), der genaue Wirkungsmechanismus dagegen unbekannt. Auf die Membranlipide wirken Alkohole als Membranverflüssiger, sie senken den Phasenübergang und vermindern den Ordnungsgrad der Membran (JANOFF & MILLER 1982). Die Wirkung auf das FS-Muster ist komplex, abhängig von der Kettenlänge des Alkohols (INGRAM 1976). Ethanol bewirkt in verschiedenen Systemen die Synthese ungesättigter FS (INGRAM 1976, BRINGER et al. 1985). Es tritt die gleiche Veränderung auf wie bei einer Absenkung der Wachstumstemperatur. Ferner gibt es Hinweise, daß Ethanol die Protonenpermeabilität der Membran erhöht. LEAO & VAN UDEN (1984) verglichen die Wirkung von Ethanol mit der eines Protonenentkopplers, durch CARTWRIGHT et al. (1986) wurde gezeigt, daß Ethanol die Proton-motive-force über der Plasmamembran bei Hefezellen aufhebt. Bei Zymomonas mobilis bewirkt Ethanol eine reduzierte Temperaturresistenz sowie erhöhte Verluste intrazellulärer Substanzen (DOMBEK et al. (1985). Angesichts der fluidisierenden und permeabilitätserhöhenden Effekte von Ethanol könnten Steroide und Hopanoide effektive "Antagonisten" zu Alkoholen sein. THOMAS et al. (1978) und BUTTKE et al. (1980) diskutierten das Vorhanden-

sein von Ergosterol in Saccharomyces cerevisiae als evolutionäre Anpassung an hohe Alkoholkonzentrationen, bei Zymomonas mobilis besteht ein Zusammenhang zwischen Ethanolkonzentration und Hopangehalt (BRINGER et al. 1984).
In der vorliegenden Arbeit konnte beim Wildtyp ein gesteigerter Hopangehalt mit erhöhter Ethanolkonzentration im Medium korreliert werden. Die Unterschiede im FS-Muster waren gering, eine leichte Verschiebung zu einer größeren Menge cyclischer FS C 19 war zu beobachten. Bei den Mutanten konnte eine vom FS-Muster abhängige unterschiedliche Sensitivität gegenüber Ethanol festgestellt werden, sowohl bei pH 4,2 als auch bei pH 2,7. Die Mutanten mit verzweigten FS hatten bei 50°C eine Wachstumshemmschwelle von 2% Ethanol gegenüber 5% bei Zellen mit cyclischen FS.
Für die Ergebnisse mit den Mutanten können verschiedene Ursachen diskutiert werden. Einmal könnten die besonderen Eigenschaften der cyclischen FS über eine Membranverfestigung für die höhere Ethanoltoleranz verantwortlich sein. Denkbar wäre auch ein Einfluß von Alkohol auf den Transport der als FS-Vorstufen benötigten Aminosäuren. Durch Ethanol beeinträchtigter Aminosäuretransport wurde bei S. cerevisiae beschrieben (THOMAS & ROSE 1979, LEAO & VAN UDEN 1984). Veränderte Transportraten lassen sich auf den energetischen Zustand der Membran zurückführen (CARTWRIGHT et al. 1986), dieser wiederum kann abhängig sein von den physikalischen Eigenschaften der Lipide, so daß ein Einfluß des FS-Musters nicht auszuschließen ist. Wachstumsversuche in Gegenwart des Protonophors CCCP ergaben gleichfalls für die Mutante mit verzweigten FS erniedrigte Hemmschwellen bei verschiedenen pH-Werten. Auch diese Versuche könnten mit der Erhöhung der Protonenpermeabilität durch CCCP besonders in Membranen mit den locker gepackten verzweigten FS gedeutet werden. Ermöglicht würde dies durch eine bessere Beweglichkeit des Protonophors in diesen Membranen. BENZ et al. (1983) konnte eine verringerte Beweglichkeit eines lipophilen Ions in Modellmembranen mit Cyclohexanfettsäuren feststellen.
Die Versuche mit Detergenzien erbrachten keine Befunde in Zusammenhang mit dem FS-Muster, die Hemmschwellen waren bei Wildtyp und Mutante gleich.

Es ist zu schließen, daß sowohl Cyclohexanfettsäuren als auch Hopanoide Membraneigenschaften fördern, die den Organismen Vorteile bieten im Hinblick auf membranschädigende Einflüsse, insbesondere Ethanol.

4.10. TEMPERATURSCHOCKVERSUCHE

Ergebnisse, gewonnen an verschiedenen Mikroorganismen, deuten auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber schnellen Änderungen der Umwelttemperatur hin (Übersicht in MC ELHANEY 1984). Das Ausmaß der Zellabtötung hängt von der Lage des Phasenüberganges ab und damit auch von der FS-Zusammensetzung der Membranlipide (H ST et al. 1972, KATSUI et al. 1981). Bei den Mutanten von B. acidocaldarius waren gleichfalls vom FS-Muster abhängige Unterschiede in der Lebensfähigkeit der Zellen nach raschen Temperaturänderungen festzustellen. Das rasche Abkühlen auf 0°C überstanden die Mutanten gut, gemessen an der sehr kurzen lag-Phase vor dem Weiterwachsen bei 50°C nach der Abkühlung. Das schnelle Erhitzen der Kulturen auf ca. 73°C für 20 Minuten wurde von den Mutanten mit verzweigten FS mit einer längeren lag-Phase beantwortet als es bei Zellen mit cyclischen FS der Fall war. Mehrmaliges Erhitzen hintereinander führte zu einer Abnahme der Lebendzellzahl bei den Mutanten mit verzweigten FS, während die mit cyclischen FS während der Versuchsdauer, teilweise nach einer lag-Phase, weiterwuchsen.
Cyclohexanfettsäuren können die Zellen bei stark erhöhten Temperaturen bzw. schnellen Temperaturerhöhungen besser vor Abtötung schützen als verzweigte FS. Als mögliche Ursache für den Verlust der Lebensfähigkeit kann die Zerstörung der Membranintegrität bei hohen Temperaturen angeführt werden, die einen Verlust intrazellulärer Substanzen sowie Protoneneinstrom zur Folge haben könnte.
Ähnliche Abfolgen von heiß und kalt können in abgemilderter Form auch am natürlichen Standort der Organismen vorkommen (STOUTJESDIJK 1977); damit stellen die Temperaturschockversuche in gewissem Sinn eine Simulation der Umweltbedingungen dar, vergleichbar dem Regentropfen, der auf den heißen Stein fällt.

4.11. TRANSPORTEXPERIMENTE

Carrier, die für den Transport gelöster Substanzen über die Membran verantwortlich sind, sind in der Regel membranumfassende, integrale Proteine. Für die korrekte Orientierung im Bilayer sind Wechselwirkungen zwischen Protein und Lipid erforderlich (SINGER 1977). Es ist daher kein überraschender Befund, daß die Transportfunktion vom physikalischen Zustand der Membranlipide abhängig ist (CRONAN & GELMANN 1975, MC ELHANEY 1982, SANDERMANN 1978). Viele Arbeitsgruppen konnten eine Beziehung zwischen den Phasenumwandlungen der Lipide und den Geschwindigkeitskonstanten der Transportprozesse (Arrhenius-Kurven) von Zuckern, Aminosäuren etc. nachweisen (z.B. HOLDEN et al. 1978, READ & MC ELHANEY 1975, THILO et al. 1977, WILSON & FOX 1971). Veränderungen der Membranlipidzusammensetzung beeinflussen eine große Anzahl zellulärer Funktionen (SPECTOR & YOREK 1985, BEEBE 1972, OHTA et al. 1977).

Auch bei den cyclohexanfettsäureauxotrophen Mutanten von B. acidocaldarius konnten mit dem Lipidmuster verbundene Einflüsse auf Transportsysteme festgestellt werden.
Bei der Lysinaufnahme ergaben sich beim Wildtyp keine wesentlichen Differenzen der Transportkonstanten bei unterschiedlichen Umweltbedingungen. Das Lineweaver-Burk-Diagramm war zweiphasig, was auf das Vorliegen zweier Transportsysteme unterschiedlicher Affinität hinweist. Die K_t-Werte liegen im Bereich der bei anderen Bakterien gefundenen Werte (LANDICK et al. 1985, BUTTON 1985). Das Vorhandensein mehrerer Transportsysteme für eine Aminosäure ist verbreitet. Für E. coli wurde ein Transportsystem beschrieben, das Arginin, Lysin und Ornithin befördert (SCHWARTZ et al. 1959) sowie ein lysinspezifisches System (ROSEN 1971).
Bei den Mutanten war bei 50°C, pH 4,2 kein fettsäurebedingter Unterschied in der Transportkinetik festzustellen, bei 61°C, pH 2,6 jedoch ergab sich bei der Mutante mit verzweigten FS nur noch ein einphasiger Kurvenverlauf des Lineweaver-Burk-Plots, der im wesentlichen dem Transportsystem mit der niederen Affinität entsprach, während bei den Zellen mit cyclischen FS die dem Wildtyp entsprechende zweiphasige Kinetik vorhanden war. Da das Fehlen der cyclischen FS bei der Mutante mit verzweigten FS bei gemäßigten Umweltbedingungen keinen

Einfluß auf den Lysintransport ausübt, kommt ein spezifisches Bedürfnis des Transportsystems für cyclische FS wohl nicht in Frage. Ein direkter Einfluß verschiedener Fettsäuren wurde beispielsweise auf den Kalium-Transport der (Na^+-K^+-)ATPase bei Säugerzellen von MARCUS et al. (1986) beschrieben. Im vorliegenden Fall dürfte eher der physikalische Membranzustand für den Ausfall des einen Transportsystems verantwortlich sein. Denkbar wäre ein zumindest teilweiser Verlust der Membranintegrität bei den extremen Bedingungen oder Störungen im Bereich der Energetisierung dieses Carriers. Bei den gleichen Bedingungen war auch ein schlechteres Wachstum der entsprechenden Mutanten feststellbar (s. 4.4.), so daß hier auf eine gemeinsame Ursache zu schließen ist.

Der Lysintransport wurde durch das Protonophor CCCP gehemmt, durch DCCD nicht; die Lysinaufnahme wird also über den Protonengradienten energetisiert, nicht über ATP. Es ist jedoch nicht bekannt, wie bei Acidophilen Kationen aufgenommen werden. In neutrophilen Bakterien erfolgt der Kationentransport direkt über das Membranpotential (innen negativ, HAMILTON 1975). Da Acidophile ein inverses Membranpotential aufweisen (innen positiv, BOOTH 1985) wurde von KRULWICH & GUFFANTI (1983) ein ATP-abhängiger Kationentransport vorgeschlagen, was für den vorliegenden Fall offenbar nicht zutrifft. Möglicherweise erfolgt doch ein gemeinsamer Transport von Lysin mit Protonen oder anderen Ionen. Überhaupt müßte die Substrataufnahme bei Acidophilen Gegenstand zukünftiger Forschungsbemühungen sein, da hier nur sehr wenige Kenntnisse vorliegen. Auch der Energiehaushalt dieser Organismen bedarf noch weiterer Klärung (COBLEY & COX 1983).

Für den Glutaminsäuretransport lagen die Transportkonstanten beim Wildtyp höher als für die Lysinaufnahme, sie zeigten außerdem Abhängigkeit von pH und Temperatur. Die Kinetik war einphasig. Die Glutaminsäureaufnahme der Mutante mit verzweigten FS war bezüglich des K_t-Wertes schlechter als bei den Zellen mit cyclischen FS. Dies beruht auf einer kompetitiven Hemmung durch die als FS-Vorstufen gefütterten Aminosäuren. Kompetitive Hemmung erfolgte gleichfalls mit den entsprechenen kurzkettigen verzweigten FS.

Aus der Literatur ist bisher kein Fall bekannt, bei dem Glutamat und die verzweigten Aminosäuren über das gleiche System aufgenommen werden (LANDICK et al. 1985), jedoch dürften für Acidophile aufgrund des abweichenden Protonisierungszustandes der Aminosäuren im sauren Milieu andere Voraussetzungen gelten.
Es wurde versucht, durch vorheriges Waschen der Zellen das Aufnahmeexperiment ohne FS-Vorstufen durchzuführen. In diesem Fall war die Transportrate schlechter und ließ sich durch Zugabe von verzweigten Aminosäuren bzw.kurzkettigen FS auf Normalniveau anheben. Die Verwertung der Vorstufen für verzweigte FS ist demnach so schlecht, daß die Mutanten in der Anpassungsphase an die Versuchsbedingungen nach dem Waschen durch das Fehlen der Vorstufen geschädigt werden. Da bezüglich der Fragestellung keine verwertbaren Aussagen gewonnen werden konnten, wurden die Versuche mit dem Glutamattransport eingestellt.
Die Messung der Glucosetransportrate (verwendet wurde 2-Desoxy-glucose) erwies sich als sehr problematisch. Selbst beim Wildtyp waren trotz gut wachsender Vorkulturen die V_{max}-Werte großen Schwankungen unterworfen. Die K_t-Werte lagen jedoch alle im gleichen Bereich. Die Mutante mit cyclischen FS erbrachte etwa die gleichen Transportleistungen wie der Wildtyp. Bei den Mutanten mit verzweigten FS konnte keine typische Kinetik aufgenommen werden, da die Aufnahme sehr schlecht war bei allen Umweltbedingungen. Da der Transport durch CCCP bei dieser Mutante schlechter gehemmt wurde als bei den Zellen mit cyclischen FS, muß bei den ersteren auf eine beträchtliche Diffusionskomponente der Aufnahme geschlossen werden. Der vor dem Aufnahmeversuch stattfindende Waschvorgang konnte als die Zellen schädigender Einfluß praktisch ausgeschlossen werden, der zeitliche Verlauf der Atmungsrate war bei den Mutanten nach dem Waschen unabhängig vom FS-Muster etwa gleich. Versuche,den Waschvorgang zu vermeiden durch vorheriges Füttern einer anderen C-Quelle erwiesen sich als nicht praktikabel, da der Glucosetransport entweder induziert werden muß oder in Anwesenheit anderer C-Quellen zu wenig Glucosecarrier vorhanden sind.

Obwohl nicht auszuschließen ist, daß die schlechte Transportrate der Zellen mit verzweigten FS durch die Versuchsbedingungen verursacht wurde, könnte doch das abweichende FS- bzw. Lipidmuster dafür verantwortlich sein. Durch viele in den letzten Jahren durchgeführte Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Lipidstruktur und der Funktion und Regulation von Membranproteinen hergestellt (MARCUS et al. 1986, SANDERMANN 1978, SPECTOR & YOREK 1985).
Beeinflußt werden die Membranproteine z.B. durch Veränderungen im FS-Muster oder in der Kopfgruppenverteilung. Bei Bakterien konzentrieren sich die Untersuchungen bisher im wesentlichen auf die Abhängigkeit der Membranfunktion vom physikalischen Zustand der Lipide (CRONAN & GELMANN 1975, MC ELHANEY 1982). Bei den FS-Mutanten müßte jedoch ein spezifisches strukturelles Bedürfnis des Glucosecarriers für Cyclohexanfettsäuren vorliegen, da nichts auf einen ungeeigneten physikalischen Membranzustand bei gemäßigten Umweltbedingungen hindeutet. An dieser Stelle lassen sich die Ergebnisse von BALDASSARE et al. (1977) anführen. Von einer FS-Mutante von E. coli wurde die Aktivität verschiedener Atmungsenzyme bei unterschiedlichem FS-Muster untersucht. Bei mehr als 85% cis-Vaccensäure verringerte sich die Aktivität dieser membrangebundenen Enzyme. Da Vaccensäure einen niedrigen Schmelzpunkt hat, ist vermutlich die erhöhte Membranfluidität für das Absinken der Enzymaktivität verantwortlich.
Bei der Messung der Atmungsrate der Mutanten unter ähnlichen Bedingungen wie bei den Transportversuchen konnte eine unmittelbare Steigerung der Atmungsrate bei Zugabe entsprechender Glucosemengen festgestellt werden. Diese war höher als die Atmungsrate, die durch die in den Transportversuchen gemessene, aufgenommene Glucosemenge ermöglicht wird bei den Mutanten mit verzweigten FS. Da das Wachstum der Mutanten auf niederen Glucosekonzentrationen im Biophotometer, unabhängig vom FS-Muster, identisch ist, können auch die Organismen mit verzweigten FS bei höheren Substratkonzentrationen genügend Glucose aufnehmen, um normales Wachstum zumindest bei gemäßigten Umweltbedingungen zu ermöglichen. Inwieweit sich die Verwendung des nicht-

metabolisierbaren Glucoseanalogen 2-Desoxyglucose auf die Versuchsergebnisse auswirkt, ist anhand der vorhandenen Daten nicht abzuschätzen, zumindest der Wildtyp und die Mutante mit cyclischen FS liefern normale Transportkonstanten mit Desoxyglucose. Falls die Aktivität des Glucosecarriers durch das Fehlen der Cyclohexanfettsäuren bereits vermindert ist, wäre es denkbar, daß ein unphysiologisches Substrat sehr viel schlechter aufgenommen wird als das natürliche, was die Diskrepanz zwischen der Transportmessung und der Messung der Atmungsrate nach Glucosezugabe erklären würde.

Obwohl der Effekt nicht genauer aufzuklären war, zeigt sich auch hier die erhöhte Empfindlichkeit der Zellen mit verzweigten FS gegenüber Umwelteinflüssen.
Der Glucosetransport war durch CCCP und DCCD hemmbar. DCCD ist ein Inhibitor der membrangebundenen ATPase, somit ist die Glucoseaufnahme ATP-abhängig.
Es sind diverse ATP-abhängige Transportsysteme bei Bakterien für Zucker, Aminosäuren, anorganische Ionen bekannt (HAROLD 1982, LANDICK et al. 1985). Sie sind jedoch noch nicht sehr gut charakterisiert. Es wird vermutet, daß auch der Protonengradient zusätzlich zur Energetisierung durch ATP eine Rolle spielt. Die bei vielen Bakterien verbreiteten Phosphotransferasesysteme für die Aufnahme von Kohlehydraten wurden bei grampositiven, strikt aeroben Organismen noch nicht beschrieben (POSTMA & LANGELER 1985).
Die im Anschluß an die Transportversuche durchgeführten Messungen der Atmungsrate ergaben für die Mutante mit verzweigten FS bei hohen Temperaturen und gleichzeitig niederen pH-Werten eine Zunahme der Atmungsrate bei absinkender Wachstumsrate. Dies deutet wiederum auf erhöhten Streß durch hohe Temperaturen und Protonenkonzentrationen hin.

4.12. HEMMSTOFFE DER STEROIDBIOSYNTHESE

Verschiedene Hemmstoffe der Steroidbiosynthese wurden auf ihre Eignung zur Hemmung der Hopanoidsynthese in intakten Zellen von B. acidocaldarius überprüft.
AMO 1618 (DOUGLAS & PALEY 1978) wirkt im zellfreien System (SECKLER & PORALLA 1986), zeigt jedoch keine Wirkung auf lebende Zellen. Vermutlich wird es von den Zellen nicht

aufgenommen.
Compactin (ENDO 1981) hemmt das Zellwachstum irreversibel. Für eine genauere Beurteilung müßte der Hopanoidgehalt bei einer Hemmstoffkonzentration mit leichter Wachstumshemmung bestimmt werden, wozu aber größere Mengen Substanz nötig sind.
Mit den Azasqualen-Derivaten (DELPRINO et al. 1983) konnte das Wachstum total gehemmt werden, allerdings konnte kein verminderter Hopangehalt an teilweise gehemmten Zellen festgestellt werden, so daß bislang kein Nachweis der Cyclasehemmung in vivo erbracht werden konnte. Bei den Kulturen mit Azasqualen konnte lediglich ein geringer Hopengehalt beobachtet werden. Ob dies mit einer zumindest teilweisen Hemmung der Cyclase zusammenhängt, müßte durch weitere Versuche geklärt werden. Es war nicht möglich, die Wachstumshemmung durch Füttern von Hopanen oder Squalen aufzuheben. Die Aufnahme der Azasqualene in die Zelle bzw. in die Membran dürfte angesichts des lipophilen Charakters der Substanzen kein Problem darstellen. Die Hemmwirkung müßte zunächst in vitro an der Squalencyclase überprüft werden, da der Mechanismus bei der Cyclisierung zu Hopan etwas anders abläuft als der der Cyclisierung zu Cholesterin (ROHMER et al. 1980 a,b).

4.13. ABSCHLUSSDISKUSION

Die physiologischen Leistungen der cyclohexanfettsäureauxotrophen Mutanten von Bacillus acidocaldarius zeigen, daß cyclische Fettsäuren nur unter extremen Bedingungen essentiell sind. Sie bieten für die Existenz der Organismen bei gleichzeitig hohen Temperaturen und Protonenkonzentrationen Vorteile. Die bisher nur an Modellmembranen gewonnenen Daten über Hopanoide und Cyclohexanfettsäuren wurden durch die Ergebnisse mit den Mutanten bestätigt; die Wirkung dieser Komponenten bezüglich der Protonenpermeabilität der Membran wurde diskutiert.
Die Versuche zeigen jedoch auch, daß es sehr schwierig ist, angesichts der komplexen Regulationsvorgänge im komplizierten Metabolismus intakter Zellen, Rückschlüsse zu ziehen aus dem beobachtbaren Verhalten der Zellen auf die Funktion

einzelner Systemkomponenten.
Dies wird zusätzlich erschwert durch den vergleichsweise geringen Kenntnisstand über B. acidocaldarius und durch die methodischen Probleme beim Umgang mit thermoacidophilen Organismen.
Um unser Wissen über diese Organismen zu erweitern, sollten sich zukünftige Arbeiten mit der Protonenpermeabilität von hopanoid- und cyclohexanfettsäurehaltigen Membranen befassen. Die energetischen Verhältnisse bei Acidophilen bedürfen noch weiterer Klärung. Auch die Regulation des Membranzustandes müßte bei diesem Organismus genauer untersucht werden, besonders hinsichtlich des komplizierten Lipidmusters. Nichts bekannt ist über die Funktion des Sulfolipids, dem eine Rolle beim Protonenausschluß zukommen könnte. Interessante Ergebnisse sind über die Regulation und Induktion von Membranenzymen, insbesondere der Fluidität, zu erwarten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

ω-Cyclohexanfettsäuren bilden die Hauptfettsäurekomponente in der Membran von Bacillus acidocaldarius, einem thermoacidophilen Bakterium. In dieser Arbeit wird die Funktion dieser Fettsäuren an cyclohexanfettsäureauxotrophen Mutanten untersucht.
Aus der temperaturabhängigen Änderung der Fettsäurezusammensetzung der Membranlipide von B. acidocaldarius und Brevibacterium pusillum ergab sich die Vermutung, daß die in diesen Organismen vorkommenden Cyclohexanfettsäuren wichtig sind bei der Anpassung an hohe Temperaturen und niedrige pH-Werte.

Es konnten einige Mutanten isoliert werden, die auxotroph sind für die Fettsäure-Vorstufe Cyclohexancarbonsäure. Diese Auxotrophie ist nur bei gleichzeitig extremen pH- und Temperaturbedingungen ausgeprägt. Bei gemäßigten Bedingungen (pH 4, 50°C) hingegen kann diese Vorstufe durch Vorstufen verzweigtkettiger Fettsäuren ersetzt werden, resultierend in einem Fettsäuremuster, das hauptsächlich durch verzweigtkettige Fettsäuren ausgemacht wird, wie es bei thermophilen Bacillus- und Thermus-Arten üblich ist. Wachstum ohne Fettsäure-Vorstufen ist nicht möglich; die Synthesekapazität für die beim Wildtyp in geringen Mengen vorkommenden verzweigten Fettsäuren reicht nicht aus beim Fehlen der cyclischen.
Weiterhin sind Zellen mit cyclischen Fettsäuren resistenter gegen Ethanol. Sie überleben auch besser Temperaturschockversuche bei hohen Temperaturen.
Es wurde die Kinetik der Lysin-, Glutaminsäure- und Desoxyglucoseaufnahme bei der Mutante und beim Wildtyp gemessen. Für den Lysintransport wurden zwei Aufnahmesysteme mit unterschiedlicher Substrataffinität gefunden. Das Transportsystem mit der hohen Affinität fällt bei den Mutanten mit verzweigten Fettsäuren bei extremen Umweltbedingungen aus. Der Glucosetransport ist bei diesen Zellen bei allen Bedingungen schlechter als bei den Mutanten mit cyclischen Fettsäuren.

Das Fehlen der Cyclohexanfettsäuren bewirkt bei den Mutanten mit verzweigten Fettsäuren erhöhte Hopanoidgehalte in der Membran. Dichtemessungen an den Lipiden ergaben für Lipide

mit Cyclohexanfettsäuren höhere Werte sowie kleinere thermische Ausdehnungskoeffizienten, verglichen mit den Lipiden mit verzweigten Fettsäuren. Dies spricht für eine festere und thermisch stabilere Membran bei den Zellen mit cyclischen Fettsäuren.
Die funktionelle Bedeutung von Cyclohexanfettsäuren und Hopanoiden bezüglich der Membraneigenschaften, besonders der Protonenpermeabilität der Membran, im Hinblick auf extreme Umweltbedingungen wird anhand der durchgeführten Versuche und der bereits bekannten physikochemischen Daten diskutiert.

Unter 35 Strukturanalogen von Cyclohexancarbonsäure wurde keines gefunden, welches die Biosynthese der Cyclohexanfettsäuren hemmt.
Hemmstoffe der Steroidbiosynthese wurden an Kulturen von B. acidocaldarius getestet, eine Einsatzmöglichkeit dieser Substanzen zur Hemmung der Hopanoidsynthese in vivo ergab sich jedoch nicht.

Insgesamt konnte durch die Arbeit eine Funktion der Cyclohexanfettsäuren für das Wachstum von B. acidocaldarius unter extremen Umweltbedingungen aufgezeigt werden.

6. L I T E R A T U R

ABBAS, C.A. & CARD, G.L. (1980): The relationship between growth temperature, fatty acid composition, and the physical state and fluidity of membrane lipids in Yersinia enterocolitica. Biochim. Biophys, Acta 602, 469-477.

ADELBERG, E.A., MANDEL, M., CHEN, G.C.C.(1965): Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in Escherichia coli. Biochem. Biophysic.Res. Commun. 18, 788-795.

BALDASSARE, J.J., BRENCKLE, G.M., HOFFMANN, M., SILBERT, D.F. (1977): Modification of membrane lipid . Functional properties of membrane in relation to fatty acid structure. J. Biol.Chem. 252, 8797-8803.

BEEBE, H.L. (1972): Transport alterations in a PE-deficient mutant of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 109, 939-942.

BELAICH, J.-P., SENEZ, J.C. (1964): Influence of aeration and of pantothenate on growth yields of Zymomonas mobilis. J. Bacteriol. 89, 1195-1200).

BENGA, G., HOLMES, R.P. (1984): Interactions between components in biological membranes and their implications for membrane function. Prog. Biophys. Mol. Biol. 43, 195-257.

BENZ, R., HALLMANN, D.,PORALLA, K., EIBL,H. (1983): Interaction of hopanoids with phosphatidylcholines containing oleic and ω-cyclohexyldodecanoic acid in lipid bilayer membranes. Chem.Phys. Lipids 34,7-24.

BISSERET, P., WOLFF, G., ALBRECHTA.M., TANAKA, T., NAKATANI, Y., OURISSON, G. (1983): A direct study of the cohesion of lecithin bilayers: The effect of hopanoids and α, ω-dihydroxy-cartenoids. Biochem. Biophys. Res. Comm. 110,320-324.

BLIGH, E.G. & DYER, W.J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37,911-917.

BLUME, A.,DREHER, R., PORALLA, K. (1978): The influence of branched-chain undω-alicyclic fatty acids on the transition temperature of Bacillus subtilis lipids. Biochim. Biophys. Acta 512,489-494.

BOTTEMA, C.D., RODRIGUEZ, R.J., PARKS, L.W. (1985): Influence of sterol structure on yeast plasma membrane properties. Biochim. Biophys. Acta 813, 313-320.

BOOTH, I.R. (1985): Regulation of cytoplasmatic pH in bacteria. Microciol. Rev. 49,359-378.

BRINGER, S., HÄRTNER, T., PORALLA, K., SAHM, H.(1985): Influence of ethanol on the hopanoid content and the fatty acid pattern in batch and continuous cultures of Zymomonas mobilis. Arch. Microbiol. 140,312-316.

BUTTKE, T.M., INGRAM, L.O. (1980): Ethanol-induced changes in lipid-composition of Escherichia coli-inhibition of saturated fatty-acid synthesis invitro. Arch. Biochem. Biophys. 203,565-571.

BUTTON,D,K, (1985): Kinetics of nutrient limited transport and microbial growth. Microbiol. Rev. 49,270-297.

CARTWRIGHT,A.G., JUROSZEK,J.-R.,BEAVAN,M.J., RUBY, F.M.S.,DE MORAIS; S.M.F., ROSE,A.H. (1986): Ethanol dissipates the proton-motive force across the plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol.132,369-377.

CHAPMAN, A.G., ATKINSON, D.E. (1977): Adenine nucleotide concentrations and turn over rates. Their correlation with biological activity in bacteria and yeast. Adv. Microbiol. Physiol. 15, 253-306.

CHAPMAN, D., HAYWARD, J.A. (1985): New biophysical techniques and their application to the study of membranes. Biochem. J. 228, 281-295.

CHAPMAN, D., WILLIAMS, R.M., LADBROOKE, B.D. (1967): Physical studies of phospholipids. Chem. Phys. Lipids 1, 445-476.

CHATTOPADHYAY, P., BANERJEE, S.K., SEN, K., CHAKRABARTI, P. (1985): Lipid profiles of Aspergillus niger and its unsaturated fatty acid auxotroph. Can. J. Microbiol. 31, 352-355.

COBLEY, J.G., COX, J.C. (1983): Energy conservation in acidophilic bacteria. Microbiol. Rev. 47, 579-595.

CRONAN, J.E., GELMANN, E. (1975): Physical properties of membrane lipids: Biological relevance and regulation. Bacteriol. Rev. 39, 232-256.

CULLEN, J.,PHILLIPS, M.C., SHIPLEY, G.G. (1971): The effect of temperature on the composition and physical properties of the lipids of Pseudomonas fluorescens. Biochem. J. 125, 733-742.

CULLIS, P.R., DE KRUYFF, B. (1979): Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. Biochim. Biophys. Acta 559, 399-420.

DANIELLI, J.F., DAWSON, H. (1935): A contribution to the theory of permeability of thin films. J. Cell Physiol. 5, 495-508.

DARLAND, G., BROCK, T.D. (1971): Bacillus acidocaldarius sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. J. Gen. Microbiol. 67, 9-15.

DARON, H.H. (1973): Nutrititional alteration of the fatty acid composition of a thermophilic bacillus species. J. Bacteriol. 116, 1096-1099.

DAVIS, B.D. (1952): Aromatic biosynthesis. Antagonism between shikimic acid and its precursor 5-dehydroshikimic acid. J. Bacteriol. 63, 749-763.

DEAMER, D.W. (1984): Proton flux across model and biological membranes. In: Membrane Processes (G. Benga, H. Baum, F.A. Kummerow, eds.), 111-120. Springer, New York.

DEINHARD, G. (1983): Taxonomische Untersuchung an thermoacidophilen Bacilli. Diplomarbeit Universität Tübingen.

DE KRUYFF, B., VAN DIJCK, P.W.M., GOLDBACH, R.W., DEMEL, R.A., VAN DEENEN, L.L.M. (1973): Influence of fatty acid and sterol composition on the lipid phase transition and activity of membrane bound enzymes of Acholeplasma laidlawii. Biochim. Biophys. Acta 330, 269-282.

DELIEU, T., WALKER, D.A. (1972): An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. New Phytol. 71, 201-225.

DELPRINO, L., BALLIANO, G., CATTEL, L., BENEVISTE, P., BOUVIER, P. (1983): Inhibition of higher plant 2,3-oxidosqualene cyclase by 2-aza-2,3-dihydrosqualene and its derivatives. J. Chem. Soc. Commun. 1983, 381-382.

DELUCA, M. (1977): Firefly luciferase.In: Adv. in Enzymology (A. Meister, ed.) 44, 37-68. J. Wiley & Sons, New York.

DEMEL, R.A., DE KRUYFF, B. (1976): The function of sterols in membranes. Biochim. Biophys. Acta 457, 109-132.

DE MENDOZA, D., CRONAN, J.E. (1983): Thermal regulation of membrane lipid fluidity in bacteria. Trends Biochem. Sci.8, 49-52.

DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., MINALE, L., BU`LOCK, J.D. (1971): Cyclohexane fatty acids from a thermophilic bacterium. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1971, 1334.

DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., BU`LOCK, J.D. (1971-1973): An isolate of Bacillus acidocaldarius, an acidophilic thermophile with unusual lipids. Giorn. Microbiol. 19-20-21, 145-154.

DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., MINALE, L., BU`LOCK, J.D. (1972): Formation of ω-cyclohexane fatty acids from shikimate in an acidophilic thermophilic bacillus. Biochem. J. 128, 751-754.

DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., BU`LOCK, J.D. (1974): Effects of pH and temperature on the fatty acid composition of Bacillus acidocaldarius. J. Bacteriol 117, 212-214.

DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., BU`LOCK, J.D. (1974): Specifity effects in the biosynthesis of fatty acids in Bacillus acidocaldarius. Phytochemistry 13, 905-910.

DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., BU`LOCK, J.D. (1976): The Caldariella group of extreme thermoacidophilic bacteria: direct comparison of lipids in Sulfolobus, Thermoplasma and the MT strains. Phytochemistry 15, 143-145.

DE ROSA, M., ESPOSITO, E., GAMBACORTA, A., NICOLAUS, B., BU`LOCK, J.D. (1980): Effects of temperature on the ether lipid composition of Caldariella acidophila. Phytochemistry 19, 827-831.

DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., GLIOZZI, A. (1986): Structure, biosynthesis and physicochemical properties of archaebacterial lipids. Microbiol. Rev. 50, 70-80.

DOMBEK, K.M., BENSCHOTER, A.S., INGRAM, L.O. (1985): Effect of temperature on the potency of ethanol as an inhibitor of growth and membrane function in Zymomonas mobilis. In: Developments in Industrial Microbiology 26, Soc. for Ind. Microbiol., Arlington, Virginia.

DOUGLAS, T.J., PALEY, L.G. (1978): AMO 1618 effects on incorporation of ^{14}C-MVA and ^{14}C-acetat into sterols in Nicotiana and Digitalis seedlings and cell-free preparations of Nicotiana. Phytochem. 17, 713-718.

DREHER, R., PORALLA, K., KÖNIG, W.A. (1976): Synthesis of ω-alicyclic fatty acids from cyclic precursors in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 127, 1136-1140.

DREWS, G. (1983): Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissenschaftler. Springer, Berlin.

EATON, L.C., ERDOS, G.W., VREELAND, N.L., INGRAM, L.O. (1981): Failure of Escherichia coli to alter its fatty acid composition in response to cholesterol-induced changes in membrane fluidity. J. Bacteriol. 146, 1151-1153.

ENDO, T., INOUE, K., NOJIMA, S., TERASHIMA, S., OSHIMA, T. (1982): Synthesis and physical properties of phosphatidylcholines, containing ω-cyclohexyl fatty acyl chains. Chem. Phys. Lipids 31, 61-74.

ENDO, A. (1981): Biological and pharmacological activities of inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Trends Biochem. Sci. 7, 10-13.

ESSER, A.F., SOUZA, K.A. (1974): Correlation between thermal death and membrane fluidity in Bacillus stearothermophilus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4111-4115.

FERGUSON, K.A., DAVIS, F.M., CONNER, R.L., LANDREY, J.L., MALLORY, F.B. (1975) Effect of sterol replacement in vivo on the fatty acid composition of Tetrahymena. J. Biol. Chem. 250, 6998-7005.

FREESE, E., SHEU, C.W., GALLIERS, E. (1973):Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. Nature 241, 321-325.

FULCO, A.J. (1984): Regulation and pathways of membrane lipid biosynthesis in Bacilli. In: Biomembranes 12, Membrane Fluidity (M. Kates, L.A. Manson, eds.), 303-327, Plenum Press, New York.

FULCO, A.J., FUJII, D.K. (1980): Adaptive regulation of membrane lipid synthesis in bacilli by environmental temperature. In: Membrane Fluidity: Biophysical Techniques and Cellular Regulation (M.Kates, A.Kuksis, eds.) 77-98. Humana Press, Clifton.

FURUYA, T., NAGUMO, T., ITOH, T., KANEKO, H. (1980): The effect of growth temperature on the lipids in an extremly thermoacidophilic bacterium TA-1. Agric. Biol. Chem. 44, 517-521.

GOLDFINE, H. (1982): Lipids of procaryotes - structure and distribution. In: Current Topics in Membranes and Transport 17 (S. Razin, S. Rottem, eds.) 1-43. Academic Press, New York.

GOLOVINSKY, E. (1984): Biochemie der Antimetabolite. VEB G. Fischer, Jena.

GORTER, E., GRENDEL, F. (1925): On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. J. Exp. Med. 41, 439-443.

GRUNER, S.M. (1985): Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition. A role for nonbilayer lipids. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.82, 3665-3669.

GRUNER, S.M., CULLIS, P. R., HOPE, M. J., TILCOCK, C. P. S. (1985): Lipid polymorphism: The molecular basis of nonbilayer phases. Annu. Rev. Biophys., Biophys. Chem. 14, 211-238.

GUFFANTI, A.A., DAVIDSON, L.F., MANN, T.M., KRULWICH, T.A. (1979): Nigericin-induced death of an acidophilic bacterium. J. Gen. Microbiol. 114, 201-206.

GULIK-KRZYWICKI, T. (1975): Structural studies on the associations between biological membrane proteins. Biochim. Biophys. Acta 415, 1-28.

HAMILTON, W.A. (1975): Energy coupling in microbial transport. Adv. Microbiol. Physiol. 12, 1-53.

HARDER, M.E., BEACHAM, R., CRONAN, J.E., BEACHAM, K., HONEGGER J.L., SILBERT; D.F. (1972): Temperature-sensitive mutant of Escherichia coli, requiring saturated and unsaturated fatty acids for growth. Isolation and properties. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3105-3109.

HAROLD, F.M. (1982): ATP-linked transport of metabolites and ions in bacteria. In: Membranes and Transport 2 (A.N. Martonosi, ed.) 1-8. Plenum Press, New York.

HARRISON, D.E.F. (1976): The regulation of respiration rate in growing bacteria. Adv. Microbiol. Physiol. 14, 243-313.

HASLAM, E. (1974): The Shikimate Pathway. Butterworths, London.

HAWROT, E., KENNEDY, E.P. (1978): Phospholipid composition and membrane function in phosphatidylserine-decarboxylase mutants of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 253, 8213-8220.

HAEST, C.W.M., VAN DEENEN, L.L.M., DE GIER, J., VAN ES, G.A., VERKLEIIJ, A.J. (1972): Fragility of the permeability barrier of Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 288,43-53.

HERRERO, A.H., GOMEZ, R.F., SNEDEIOR, B., TOLMAN, C.J., ROBERTS, N.F. (1985): Growth inhibition of Clostridium thermocellum by carboxylic acids. A mechanism based on uncoupling by weak acids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22, 53-62.

HIPPCHEN, B., RÖLL, A., PORALLA, K. (1981): Occurence in soil of thermoacidophilic Bacilli posessing ω-cyclohexane fatty acids and hopanoids. Arch. Microbiol. 129, 53-55.

HOLDEN, J.T., BOLEN, J., EASTON, J.A., DE GROOT, J. (1978): Heterogeneous amino acid transport rate changes in an E. coli unsaturated fatty acid auxotroph. Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 588-595.

HURST, A., OFORI, E. (1984): Adaptional changes in Staphylococcus aureus MF 31 grown above its maximum temperature when protected by sodium chloride: lipid studies. Can. J. Microbiol. 30, 1424-1427.

INGRAM, L.O. (1976): Adaptation of membrane lipids to alcohols. J. Bacteriol. 125, 670-678.

INGRAM, L.O., BUTTKE, T.M. (1984): Effect of alcohols on microorganisms. Adv. Microbiol. Physiol. 25, 253-300.

JANOFF, A.S., MILLER, K.W. (1982): A critical assessment of the lipid theories of general anaesthetics action. In: Biological Membranes (D.Chapman, ed.) 417-476, Academic Press, New York.

JUNI, E., HEYM, G.A., BRADLEY, R.A. (1984): General approach to bacterial nutrition: growth factor requirements of Moraxella nonliquefans. J. Bacteriol. 160, 958-965.

KANEDA, T. (1966): Biosynthesis of branched chain fatty acids. IV. Factors affecting relative abundance of fatty acids produced by Bacillus subtilis. Can. J. Microbiol. 12, 501-514.

KANEDA, T. (1973): Biosynthesis of branched long-chain acids from related short-chain α-keto acid substrates by a cell-free system of Bacillus subtilis. Can. J. Microbiol. 19, 87-96.

KANEDA, T. (1977): Fatty acids of the genus Bacillus: An example of branched chain preference. Bacteriol. Rev. 41, 391-418.

KANNENBERG, E. (1983): Membraneigenschaften von Hopanoiden und Lipiden, die Fettsäuren mit endständigen Verzweigungen und ω-cyclohexanringen enthalten. Dissertation Universität Tübingen.

KANNENBERG, E., BLUME, A., MC ELHANEY, R.N., PORALLA, K. (1983): Monolayer and calorimetric studies of phosphatidylcholines containing branched chain fatty acids and their interactions with cholesterol and with a bacterial hopanoid in model membranes. Biochim. Biophys. Acta 733, 111-116.

KANNENBERG, E., BLUME, A., PORALLA, K: (1984): Properties of ω-cyclohexane fatty acids in membranes. FEBS Lett. 172, 331-334.

KANNENBERG, E., BLUME, A., GECKELER, K., PORALLA, K. (1985): Properties of hopanoids and phosphatidylcholines containing ω-cyclohexane fatty acids in monolayer and liposome experiments. Biochim. Biophys. Acta 814, 179-185.

KANNENBERG, E., BLUME, A., MC ELHANEY, R.N., PORALLA, K. (1986): Mixed monolayer studies of the interactions of synthetic phosphatidylcholines containing branched fatty acids and a hopane glycolipid isolated from the thermo-acidophilic bacterium Bacillus acidocaldarius. Chem. Phys. Lipids 39, 145-153.

KARL, D.M. (1980): Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. Microbiol. Rev. 44, 739-796.

KATES, M. (1972): Isolation, analysis and identification of lipids. In: Technics of Lipidology (T.S.Work, E. Work, eds.) North Holland Publishing Company, Amsterdam, American Elsevier, New York.

KATSUI, N., TSUCHIDO, T., TAKANO, M., SHIBASAKI, I.(1981): Effect of preincubation temperature on the heat resistance of Escherichia coli having different fatty acid compositions J. Gen. Microbiol. 122, 357-361.

KIENER, A., HOLLINGER, C., LEISINGER, T. (1984): Analogue-resistant and auxotrophic mutants of Methanobacterium thermoautotrophicum. Arch. Microbiol. 139, 87-90.

KRATKY, O., LEOPOLD, H., STABINGER, H. (1973): The determination of the partial specific volume of proteins by the mechanical oscillator technique. In: Methods in Enzymology (C.H.W. Hirs, S.N. Timasheff, eds.) 27, 98-110. Academic Press, New York.

KRISCHKE, W. (1982): Die Isolierung und Charakterisierung pH- und temperatursensitiver Mutanten von Bacillus acidocaldarius. Diplomarbeit Universität Tübingen.

KRULWICH, T.A., GUFFANTI, A.A. (1983): Physiology of acidophilic and alcalophilic bacteria. Adv. Microbiol. Physiol. 24, 173-214.

KRULWICH, T.A., DAVIDSON, L.F., FILIP, S.J., ZUCKERMAN, R.S., GUFFANTI, A.A. (1978): The protomotive force and β-galactoside transport in Bacillus acidocaldarius. J. Biol. Chem. 253, 4599-4603.

LANDICK, R., OXENDER, D.L., AMES, G.F.-L. (1985): Bacterial amino acid transport systems. In: The Enzymes of Biological Membranes 3, Membrane Transport (A.N. Martonosi, ed.) 577-615, Plenum Press, New York.

LANDS, W.E.M., DAVIS, F.S. (1984): Fluidity of membrane lipids. In: Biomembranes 12, Membrane Fluidity (M.Kates, L.A. Manson, eds.) 475-515. Plenum Press, New York.

LANGWORTHY, T.A.,MAYBERRY, W.R., SMITH, P.F. (1976): A sulfonolipid and novel glucosamidyl glycolipids from the extreme thermoacidophile Bacillus acidocaldarius. Biochim. Biophys. Acta 431, 550-569.

LANGWORTHY, T.A., MAYBERRY; W.R. (1976): 1,2,3,4-tetrahydroxypentane-substituted pentacyclic triterpene from Bacillus acidocaldarius. Biochim. Biophys. Acta 431, 570-577.

LANGWORTHY, T.A. (1978): Microbial life in extreme pH values. In: Microbial Life in Extreme Environments (D.J. Kushner, ed.) 279-317. Academic Press, London.

LANGWORTHY, T.A. (1982): Lipids of bacteria living in extreme environments. In: Current Topics in Membranes and Transport 17 (S. Razin, S. Rottem, eds.) 55-78, Academic Press, New York.

LANGWORTHY, T.A. (1985): Lipids of archaebacteria. In: The Bacteria Vol VIII (I.C. Gunsalus, R.Y.Stanier, eds.) 459-497, Academic Press, New York.

LARSSON, C.M., OLSSON, T. (1979): Firefly assay of adenine nucleotides from algae: Comparison of extraction methods. Plant & Cell Physiol. 20, 145-155.

LEAO, C., VAN UDEN, N. (1984): Effect of ethanol and other alcanols on the general amino acid permease of Saccharomyces cerevisiae. Biotechnol. Bioeng. 26, 403-405.

LEAO, C., VAN UDEN, N. (1985): Effect of ethanol and other alcanols on the temperature relations of glucose transport and fermentation in Saccharomyces cerevisiae. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22, 359-363.

LEDERBERG, J., LEDERBERG, E.M. (1952): Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol. 63, 399-406.

LE GRIMELLEC, C., LEBLANC, G. (1978): Effect of membrane cholesterol on potassium transport in Mycoplasma mycoides var. capri (PG 3). Biochim. Biophys. Acta 514, 152-163.

LEWIS, R.N.A.H., MC ELHANEY, R.N. (1985): Thermotropic phase behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing ω-cyclohexyl fatty acids. Differential scanning calorimetric and ^{31}P NMR spectroscopic studies. Biochemistry 24, 4903-4911.

LOW, C., RODRIGUEZ, R.J., PARKS, L.W. (1985): Modulation of yeast plasma membrane composition of a yeast sterol auxotroph as a function of exogenous sterol. Arch. Biochem. Biophys. 240, 530-538.

LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

LUNDIN, A., THORE, A. (1975): Comparison of methods for extraction of bacterial adenine nucleotides determined by firefly assay. Appl. Microbiol. 30, 713-721.

MAHAJAN, S., KHULLER, G.K. (1984): Cerulenin effect on phospholipid metabolism in Mycobacterium smegnatis ATCC 607. Biochim. Biophys. Acta 795, 493-498.

MANTSCH, H.H., MADEC, C., LEWIS, R.N.A.H., MC ELHANEY, R.N. (1985): Thermotropic phase behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing iso-branched fatty acids. 2. Infrared and ^{31}P NMR spectroscopic studies. Biochemistry 24, 2440-2446.

MARCUS, M.M., APELL, H.-J., ROUDNA, M., SCHWENDENER, R.A., WEDER, H.G., LÄUGER, P. (1986): (Na^+-K^+)-ATPase in artificial lipid vesicles: Influence of lipid structure on pumping rate. Biochim. Biophys. Acta 854, 270-278.

MC ELHANEY, R.N. (1974): The effect of alterations in the physical state of the membrane lipids on the ability of Acholeplasma laidlawii B to grow at various temperatures. J. Mol. Biol. 84, 145-157.

MC ELHANEY, R.N. (1982): Effects of membrane lipids on transport and enzymic activities.In: Current Topics in Membranes and Transport 17 (S. Razin, S. Rottem, eds.) 317-380. Academic Press, New York.

MC ELHANEY, R.N. (1984): The relationship between membrane fluidity and phase state and the ability of bacteria and mycoplasmas to grow and survive at various temperatures. In: Biomembranes 12, Membrane Fluidity (L.A. Manson, M. Kates eds.) 249-278. Plenum Press, New York.

MC ELHANEY, R.N., DE GIER, J., VAN DER NEUT-KOK, E.C.M. (1973): The effect of alterations in the fatty acid composition and cholesterol content on the non-electrolyte permeability of Acholeplasma laidlawii B cells and derived liposomes. Biochim Biophys Acta 298, 500-512.

MC ELHANEY, R.N., SOUZA, K.A. (1976): The relationship between environmental temperature, cell growth and the fluidity and physical state of the membrane lipids of Bacillus stearothermophilus. Biochim. Biophys. Acta 443, 348-359.

MELCHIOR, D.L., (1982): Lipid phase transitions and regulation of membrane fluidity in prokaryotes. In: Current Topics in Membranes and Transport 17 (S. Razin, S. Rottem, eds.) 263-316. Academic Press, New York.

MELCHIOR, D.L., MOROWITZ, H.J., STURTEVANT, J.M., TSONG, T.-Y. (1970): Phase transitions of membrane lipids. Biochim. Biophys. Acta 219, 114-122.

MELCHIOR, D.L., STEIM, J.M. (1976): Thermotropic transitions in biomembranes. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 5, 205-238.

MICHELS, M., BAKKER, E.P. (1985): Generation of a large, protonophore-sensitive protonmotive force in the acidophilic bacteria Thermoplasma acidophilum and Bacillus acidocaldarius. J. Bacteriol. 161, 231-237.

MINNIKIN, D.E., ABDOLRAHIMZADEH, H. (1974): Effect of pH on the proportions of polar lipids in chemostat cultures of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 120, 999-1003.

MITCHELL, P. (1961): Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chain osmotic type of mechanism. Nature 191, 144-148.

NAGLE, J.F., TRISTRAM-NAGLE, S. (1983): Hydrogen bonded chain mechanism for proton conduction and proton pumping. J. Membr. Biol. 74, 1-44.

NICHOLS, J.W., DEAMER, D.W. (1980): Net proton-hydroxyl permeability of large unilamellar liposomes measured by an acid-base titration technique. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 2038-2042.

OH-HASHI, Y., OKUYAMA, H. (1986): Effects of the temperature range and the lack of β-ketoacyl-carrier protein synthase II on fatty acid synthesis in Escherichia coli K 12 after shifts in temperature. Biochim. Biophys. Acta 876, 146-153.

OHYA, H., KOMAI, Y., YAMAGUCHI, M. (1986): Zinc tolerance of an isolated bacterium containing ω-cyclohexyl fatty acids. FEMS Microbiol. Lett. 34, 257-260.

OHTA, T., OKUDA, S., TAKAHASHI, H. (1977): Relationship between phospholipid compositions and transport activities of amino acids in Escherichia coli membrane vesicles. Biochim. Biophys. Acta 466, 44-56.

ORDONEZ, J.A., DE LA HOZ, 1., AZCONA, J.I., SANZ, B. (1985): Effect of growth temperature on lipid composition of Streptococcus faecium. Can. J. Microbiol. 31, 361-366.

OSHIMA, M., ARIGA, T. (1975): ω-Cyclohexyl fatty acids in acidophilic thermophilic bacteria. J. Biol. Chem. 250, 6963-6968.

OURISSON, G., ALBRECHT, P., ROHMER, M. (1979): The hopanoids-palaeochemistry and biochemistry of a group of natural products. Pure & Appl.Chemistry 51, 709-729.

OURISSON, G., ROHMER, M., ANTON, A. (1979): From terpenes to sterols. Macroevolution and microevolution. Recent Adv. Phytochem. 13, 236-239.

PAPAHADJOPOULOS, D., NIR, S., OHKI, S. (1971): Permeability properties of phospholipid membranes: Effect of cholesterol and temperature. Biochim. Biophys. Acta 266, 561-583.

PARDEE, A.B. (1971): Membranes and the coordination of cellular activities. In: Biomembranes 2 (L.A. Manson, ed.) 1-2 Plenum Press, New York.

PLUSCHKE, G., HIROTA, Y., OVERATH, P. (1978): Function of phospholipids in E. coli. Characterization of a mutant deficient in cardiolipin synthesis. J. Biol. Chem. 253, 5048-5055.

POND, J.L., LANGWORTHY, T.A., HOLZNER, G. (1986): Long chain diols: A new class of membrane lipids from a thermophile bacterium. Science 231, 1134-1136.

POSTMA, P.W., LENGELER, J.W. (1985): Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. Microbiol. Rev. 49, 232-269.

PRIVALOV, P.L., PLOTNIKOW, V.V., FILIMONOV, V.V. (1975): Precision scanning microcalorimeter for the study of lipids. J. Chem. Thermodyn. 7, 41.

PORALLA , K. (1982): Considerations on the evolution of steroids as membrane components. FEMS Microbiol. Lett. 13, 131-135.

PORALLA, K., KANNENBERG, E., BLUME, A. (1980): A glycolipid containing hopane isolated from the acidophilic, thermophilic Bacillus acidocaldarius has a cholesterol-like function in membranes. FEBS Lett. 113, 107-110.

PORALLA, K., KÖNIG, W.A. (1983): The occurence of ω-cycloheptane fatty acids in a thermo-acidophilic bacillus. FEMS Microbiol. Lett. 16, 303-306.

PORALLA, K., HÄRTNER, T., KANNENBERG, E. (1984): Effect of temperature and pH on the hopanoid content of Bacillus acidocaldarius. FEMS Microbiol. Lett. 23, 253-256.

RAY, P.H., WHITE, D.C., BROCK, T.D. (1971): Effect of temperature on the fatty acid composition of Thermus aquaticus. J. Bacteriol. 106, 25-30.

READ, B.D., MC ELHANEY, R.N. (1975): Glucose transport in Acholeplasma laidlawii B: Dependence on the Fluidity and the physical state of the membrane lipids. J. Bacteriol. 123,47-55.

REINERT, J.C., STEIM, J.M. (1970): Calorimetric detection of a membran-lipid phase transition in living cells. Science 168, 1580-1582.

REIZER, J., GROSSOWICZ, N., BARENHOLZ, Y. (1985): The effect of growth temperature on the thermotropic behavior of the membranes of a thermophilic bacillus. Composition-structure-function relationship. Biochim. Biophys. Acta 815, 268-280.

RODRIGUEZ, R.J., LOW, C., BOTTEMA, C.D.K., PARKS, L.W. (1985): Multiple functions for sterols in Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta 837, 336-343.

ROHMER, M., OURISSON, G. (1976): Structure des bactériohopanetétrols d'Acetobacter xylinum. Tetrahedron Lett. 1976, 3633-3636.

ROHMER, M., BOUVIER, P., OURISSON, G. (1979): Molecular evolution of biomembranes: Structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 847-851.

ROHMER, M., ANDING, C., OURISSON, G. (1980a): Nonspecific biosynthesis of hopane triterpenes by a cell-free system from Acetobacter pasteurianum.

ROHMER, M., BOUVIER, P., OURISSON, G. (1980b): Nonspecific lanosterol and hopanoid biosynthesis by a cell-free system from the bacterium Methylococcus capsulatus. Eur. J. Biochem. 112, 557-560.

ROHMER, M., BOUVIER-NAVE, P., OURISSON, G. (1984): Distribution of hopanoid triterpenes in procaryotes. J. Gen. Microbiol. 130, 1137-1150.

RÖLL, A., Über das Vorkommen von Hopanoiden in vegetativen Zellen und Cysten von Azotobacter vinelandii und in neu isolierten, thermoacidophilen Bacillus-Arten. Diplomarbeit Universität Tübingen (1981).

ROSEN, B.P., (1971): Basic amino acid transport in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 264, 3653-3662.

ROSSIGNOL, M., THOMAS, P., GRIGNON, G. (1982): Proton permeability of liposomes from natural phospholipid mixtures. Biochim. Biophys. Acta 684, 195.

RUSSEL, N.J. (1984): Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: Blueprints for survival. Trends Biochem. Sci. 9, 108-112.

SANDERCOCK, S.P., RUSSEL, N.J. (1980): The elongation of exogenous fatty acids and the control of phospholipid acyl chain-length in Micrococcus cryophilus. Biochem. J. 188, 585-592.

SANDERMANN, H. (1978): Regulation of membrane enzymes by lipids. Biochim. Biophys. Acta 515, 209-237.

SCHLEGEL, H.G. (1985): Allgemeine Mikrobiologie. G. Thieme Stuttgart.

SCHMIDT, G., KNOLL, W. (1985): Densitometric characterization of aqueous lipid dispersions. Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 89, 36-43.

SCHWARTZ, J.H., MAAS, W.K., SIMON, E.J. (1959): An impaired transport mechanism for amino acids in mutants of Escherichia coli resistant to L-canavanine and D-serine. Biochim. Biophys. Acta 32, 582-583.

SECKLER, B., PORALLA, K. (1986): Characterization and partial purification of squalene-hopene cyclase from Bacillus acidocaldarius. Biochim. Biophys. Acta 881, 356-363.

SEELIG, J., SEELIG, A. (1980): Lipid conformation in model membranes and biological membranes. Quart. Rev. Biophys. 13, 19-61.

SHEU, C.W., FREESE, E. (1972): Effects of fatty acids on growth and envelope proteins of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 111, 516-524.

SHIBUYA, I., MIYAZAKI, C., OHTA, A. (1985): Alteration of phospholipid composition by combined defects in phosphatidylserine and cardiolipin synthases and physiological consequences in Escherichia coli. J. Bacteriol. 161, 1086-1092.

SILBERT, D.F., LADENSON, R.C., HONEGGER, J.L. (1973): The unsaturated fatty acid requirement in Escherichia coli. Temperature dependence and total replacement by branched-chain fatty acids. Biochim. Biophys. Acta 311, 349-361.

SILVIUS, J.R., MC ELHANEY, R.N. (1979): Effect of phospholipid acyl chain structure on physical properties. 1: Isobranched phosphatidylcholines. Chem. Phys. Lipids 24, 287-296.

SILVIUS, J.R., MC ELHANEY, R.N. (1979): Effect of phospholipid acyl chain structure on thermotropic phase properties. 3: Phosphatidylcholines with L- or DL-antéisoacylchains. Chem. Phys. Lipids 25, 125-134.

SILVIUS, J.R., MC ELHANEY, R.N. (1980): Membrane lipid physical state and modulation of the Na^{+}, Mg^{++}-ATPase activity in Acholeplasma laidlawii B. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 1255-1259.

SINENSKY, M. (1974): Homeoviscous adaptation-a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 523-525.

SINENSKY, M., KLEINER, J. (1981): The effect of reagents that increase membrane fluidity on the activity of3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase in the CHO-K 1 cell. J. Cell Physiol. 108, 309-316.

SINGER, S.J. (1977): Thermodynamics, the structure of integral membrane proteins, and transport. J. Supramol. Struct. 6, 313-323.

SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175, 720-731.

SKIPSKY, V.P., BARCLAY, M. (1969): Thin-layer chromatography of lipids. In: Methods in Enzymology 14, 530-598, Academic Press, London.

SONNLEITNER, B. (1980): Biotechnology of thermophilic bacteria - growth, products and application. Adv. Biochem. Bioeng./Biotechnol. 28, 69-138.

SOUZA, K.A., KOSTIV, L.L., TYSON, B.J. (1974): Alterations in normal fatty acid composition in a temperature-sensitive mutant of a thermophilic Bacillus. Arch. Microbiol. 97, 89-102.

SPECTOR, A.A., YOREK, M.A. (1985): Membrane lipid composition and cellular function. J. Lipid Res. 26, 1015-1035.

STEIM, J.M. (1968): Spectroscopic and calorimetric studies of biological membrane structure. In: Molecular Association in Biological and Related Systems (R.F. Gould. ed.) 259-302. Am. Chem. Soc., Washington, D.C.

STEIM, J.M. (1970): Thermal phase transitions in biomembranes. Liq. Cryst. Ordered Fluids 1, 1-11.

STEPHEN, H., STEPHEN, T. (1963): Solubilities of inorganic and organic compounds. Pergamon Press, Oxford.

STIEGLITZ, B., CALVO, J.M. (1971): Effect of 4-azaleucine upon leucine metabolism in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 108, 95-104.

STOUTJESDIJK, R. (1977): High surface temperatures of trees and pine litter in the winter and their biological importance. Int. J. Biometeorol. 21, 325-331.

STUBBS, C.D. (1983): Membrane fluidity: structure and dynamics of membrane lipids. Essays in Biochemistry 19, 1-39.

SULLIVAN, K.H., HEGEMAN, G.D., CORDES, E.H. (1979): Alteration of the fatty acid composition of Escherichia coli by growth in the presence of normal alcohols. J. Bacteriol. 138, 133-138.

SUNAMOTO, J., IWAMOTO, K., INOUE, K., ENDO, T., SHOSHICHI, N., (1982): Liposomal membranes. XI. Suggestion to structural characteristics of acido-thermophilic bacterial membranes. Biochim. Biophys. Acta 685, 283-288.

SÜSSMUTH, R., LINGENS, F. (1969): Beständigkeit des NNMG, Beziehung zwischen Mutationsrate und Aufnahme des Mutagens durch die Zelle und Förderung der Methylierung durch Sulfhydrylgruppen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Z. Naturforschg. 24 b, 903-910.

SUZUKI, K-I., SAITO, K., KAWAGUCHI, A., OKUDA, S., KOMAGATA, K. (1981): Occurence of ω-cyclohexyl fatty acids in Curtobacterium pusillum strains. J. Gen. Appl. Microbiol. 27, 261-266.

THILO, L., TRÄUBLE, H., OVERATH, P. (1977): Mechanistic interpretation of the influence of lipid phase transitions on transport functions. Biochemistry 16, 1283-1290.

THOMAS, D.S., HOSSACK, J., ROSE, A.H. (1978): Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae. Arch Microbiol. 117, 239-245.

THOMAS, D.S., ROSE, A.H. (1979): Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by Saccharomyces cerevisiae as affected by plasma-membrane lipid composition. Arch. Microbiol. 122, 49-55.

UCHINO, F., DOI, S. (1967): Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. Agri. Biol. Chem. 31, 817-822.

WARD, J.B., ZAHLER, S.A. (1973): Regulation of leucine biosynthesis in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 116, 727-735.

WARREN, G.B., HOUSLAY, M.D., METCALFE, J.C., BIRDSALL, N.J.M. (1975): Cholesterol is excluded from the phospholipid annulus surrounding an active calcium transport protein. Nature 255, 684-687.

WEERKAMP, A., HEINEN, W. (1972): Effect of temperature on the fatty acid composition of the extreme thermophiles, Bacillus caldolyticus and Bacillus caldotenax. J. Bacteriol. 109, 443-446.

WEERKAMP, A., HEINEN, W. (1972): The effect of nutrients and presursors on the fatty acid composition of two thermophile bacteria. Arch. Microbiol. 81, 350-360.

WELLS, M.A., DITTMER, J.C. (1963): The use of sephadex for the removal of nonlipid contaminants from lipid extracts. Biochemistry 2, 1259-1263.

WIESLANDER, A., RILFORS, L. (1977): Qualitative and quantitative variations of membrane lipid species in Acholeplasma laidlawii A. Biochim. Biophys. Acta 466, 336-346.

WILLE, W., EISENSTADT, E., WILLECKE, K. (1975): Inhibition of denovo fatty acid synthesis by the antibiotic cerulenin in Bacillus subtilis: Effects on citrate-Mg^{++} transport and synthesis of macromolecules. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 8, 231-237.

WILLECKE, K., PARDEE, A.B. (1971): Fatty acid requiring mutant of Bacillus subtilis defective in branched chain α-ketoacid dehydrogenase. J. Biol. Chem. 246, 5264-5272.

WILSON, G., FOX, C.F. (1971): Biogenesis of microbial transport systems: Evidence for coupled incorporation of newly synthesized lipids and proteins into membrane. J. Mol. Biol. 55, 49-60.

YEAGLE, P.L. (1985): Cholesterol in the cell membrane. Biochim. Biophys. Acta 822, 267-287.

YU, C., YU, L., KING, T.E. (1975): Studies of cytochrome oxidase:Interactions of the cytochrome oxidase protein with phospholipids and cytochrome c. J. Biol. Chem. 250, 1383-1392.

ZEMLYANUKHINA, O.A., KOLCHEV, W., NESMEYAN, M.A. (1981): Influence of lipotropic agents of alcohols on the biosynthesis and repression of secreted alkaline phosphatase in Escherichia coli. Biochem. SSR 46, 70-75.

L E B E N S L A U F

Wolfgang Krischke,

11. Juni 1955	geboren in München als Sohn des Buchhalters Josef Krischke und seiner Frau Herta, geb. Lidermann.
1962 - 1966	Grundschule in Raidwangen
1966 - 1974	Max-Planck-Gymnasium in Nürtingen
Juni 1974	Abitur
Juli 1974 - September 1975	Wehrdienst in Lingen/Ems
Oktober 1975 - Juli 1976	Studium des Maschinenbaus an der TU Stuttgart
Oktober 1976	Immatrikulation an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Studienfach Biologie
Oktober 1981 - November 1982	Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. K. Poralla, Inst. Biologie II, Mikrobiologie I
23. November 1982	Diplomprüfung in Biologie
Januar 1983 - Juni 1986	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. K. Poralla, Biologie II, Mikrobiologie I. Thema: "Untersuchungen zur Funktion von ω-Cyclohexanfettsäuren in Bacillus acidocaldarius".
Juli 1981	Heirat mit Barbara Teufel-Krischke, geb. Teufel
November 1983	Geburt unseres Sohnes Stefan.

Meine akademischen Lehrer waren:

L.-J. Adam, R. Agerer, D. Ammermann, R. Apfelbach, C.-F. Bardele, F.W. Bentrup, W.-U. Berthold, V. Braun, D. Bunke, H. Dahmen, H. Drautz, W. Engels, H. Erkert, E. Fischer, K. G. Grell, K. G. Götz, J. Guglielmi, A. Hager, K.G. Hantke, W. Harder, W.-U. an der Heiden, G. Jung, O. Klee, E. Kulzer, H.P. Lange, H. Meier, G. Mickoleit, F.P. Möhres, H. Netzel, F. Oberwinkler, W. Pfeiffer, K. Poralla, W. Rähle, A. Rieker, W. Rossbach, H. Schenk, R. Schief, H.U. Schnitzler, B. Schwemmle, H. Seiler, H.U. Seitz, W. Seyffert, J. Strähle, G. Weitzel, A. Wendel, G. Winkelmann, H. Zähner.